

**UNIVERSITÉ PARIS DIDEROT - PARIS VII**  
**ÉCOLE DOCTORALE MATIÈRE CONDENSÉE ET INTERFACES**

**Laboratoire Matière et Systèmes Complexes**

**THÈSE DE DOCTORAT**  
**Biophysique**

**Camille GAMBINI**

**LA MORPHOGENÈSE GASTROVASCULAIRE**  
**DE LA MÉDUSE AURELIA AURITA**

**Thèse dirigée par Annemiek J.M. CORNELISSEN**  
Soutenue le 28 juin 2012

**JURY**

Mme. Nadine PEYRIÉRAS

M. Claude VERDIER

M. Atef ASNACIOS

M. Arezki BOUDAUD

M. Vincent FLEURY

M. Konstantin KHALTURIN

Mme. Annemiek J.M. CORNELISSEN

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Examineur

Examineur

Directrice de thèse



# Résumé

La morphogenèse dans le vivant est contrôlée par un ensemble complexe de processus, parmi lesquels la physique joue un rôle essentiel. Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes intéressé aux processus mécaniques d'auto-organisation qui guident la morphogenèse gastrovasculaire de la méduse *Aurelia aurita*. Le système gastrovasculaire de cette méduse est constitué d'un réseau branché de canaux, dont le rôle est de distribuer les nutriments et l'oxygène dans son ombrelle, et dont l'organisation est relativement simple. Nous avons observé la croissance de ce réseau de canaux et étudié la structure et les propriétés mécaniques des tissus qui les entourent. Les canaux grandissent dans un mince feuillet cellulaire plat, l'endoderme, et sont entourés par de la matrice extracellulaire. Ces différents tissus sont comprimés périodiquement par des contractions musculaires. Des expériences de macro- et microrhéologie ont montré que la matrice apparaît comme un gel viscoélastique mou, dont la structure et les propriétés mécaniques évoluent au cours du développement de la méduse. Cette évolution peut être mise en rapport avec les contraintes physiques particulières subies par la matrice lors des contractions musculaires. Par ailleurs, nous avons montré par microscopie optique et électronique que les canaux croissent localement par accumulation, empilement et différenciation des cellules de l'endoderme en cellules de canal. Des simulations numériques et des résultats expérimentaux suggèrent que ce processus est induit par une accumulation locale des contraintes de compression dans l'endoderme, à l'extrémité des canaux en croissance, à chaque contraction musculaire de la méduse.

**Mots Clés :** méduse, morphogenèse, mécanique, croissance, viscoélasticité, différenciation

# Abstract

Morphogenesis of living systems is controlled by a complex of processes in which also physics plays an essential role. In this PhD thesis, we have investigated mechanical self-organized processes involved in gastrovascular morphogenesis of the jellyfish *Aurelia aurita*. The gastrovascular system of this jellyfish is a branched network of canals, which role is to distribute nutrients and oxygen in its umbrella. The organization of this network is relatively simple. We have observed the growth of this canal network and studied the structure and mechanical properties of the surrounding tissues. Canals grow in a flat and thin cellular sheet, the endoderm, and are surrounded by the extracellular matrix. These different tissues are periodically compressed by muscular contractions. Macro- and microrheology experiments have shown that the extracellular matrix behaves as a soft viscoelastic gel, which structure and mechanical properties evolve during jellyfish development. These changes can be put in connection with physical constraints exerted in the extracellular matrix by muscular contractions. Besides, we have shown by optic and electronic microscopy that canals grow locally by accumulation, stacking and differentiation of endodermal cells into canal cells. Numerical simulations and experimental results suggest that this process is induced by compressive constraints, which are locally enhanced in the endoderm, at the tip of a growing canal, during each muscular contraction of the jellyfish.

**Keywords:** jellyfish, morphogenesis, mechanics, growth, viscoelasticity, differentiation

**Title:** gastrovascular morphogenesis of the jellyfish *Aurelia aurita*

Laboratoire Matière et Systèmes Complexes (MSC),  
UMR 7057 CNRS, Université Paris VII Diderot,  
75205 Paris Cedex 13, France



# Remerciements

Je tiens à remercier en premier lieu Annemiek Cornelissen, ma directrice de thèse, de m'avoir proposé ce si beau sujet. J'ai énormément apprécié la qualité de son encadrement, sa bienveillance et sa disponibilité. Elle était toujours présente et ne comptait pas son temps pour discuter avec moi de l'avancée de mon travail. Elle m'a énormément aidée à construire de nombreuses collaborations scientifiques, qui ont été extrêmement précieuses pour l'avancée de mon travail, qui se situe dans un champ très interdisciplinaire. Elle m'a toujours encouragée à participer à un grand nombre de conférences, de congrès, et d'écoles d'été scientifiques, qui m'ont permis d'entrevoir la richesse et la variété du spectre de la recherche à l'interface entre la physique et la biologie, et de présenter et discuter de mon travail avec de nombreux chercheurs d'horizons très divers. J'ai eu la chance de pouvoir initier et développer un travail scientifique à ses côtés, quasiment 'de A à Z', depuis l'achat du matériel scientifique, la construction des expériences, la mise en place des collaborations scientifiques, jusqu'à l'interprétation des résultats, et enfin leur diffusion. J'ai eu le plaisir, au cours de ma thèse, de pouvoir être progressivement de plus en plus autonome dans mon travail de recherche, et, tout en interagissant constamment avec elle et les chercheurs avec qui nous collaborions, d'avoir pu disposer d'une grande liberté dans les orientations de mon travail. J'ai enfin eu la chance de pouvoir encadrer, de près ou de loin selon les cas, plusieurs stagiaires, et de leur faire découvrir les méduses et leurs secrets...

Ce travail de thèse a été effectué au laboratoire Matière et Systèmes Complexes de l'Université Paris VII, et j'en remercie les directeurs successifs, Jean-Marc di Meglio et Loïc Auvray.

J'adresse tous mes remerciements aux rapporteurs, Nadine Peyri  ras et Claude Verdier, qui ont accepté de prendre le temps de lire ce manuscrit, ainsi qu'Atef Asnacios, Arezki Boudaoud, Vincent Fleury et Konstantin Kahlturin, qui m'ont fait l'honneur de faire partie du jury, et de se déplacer pour venir prendre part à la discussion.

Ce travail n'aurait pas été possible sans l'aide et l'expertise des chercheurs et ingénieurs de recherche avec lesquels nous avons collaboré, et que je remercie vivement : Bérengère Abou en micror  ologie, Alain Ponton en macror  ologie, Alexis Peaucelle en biologie du développement, Benjamin Mauroy, Philippe Dantan, et Ken Sekimoto pour les modélisations numériques, Stefano Tiozzo pour la biologie des cnidaires, Nathalie Luciani pour la fixation des méduses, Marie-Alice Gu  deau-Boudeville (Booboo) pour l'entretien des méduses, et enfin Vincent Fleury, qui, avec Annemiek Cornelissen, a initié l'étude de la morphog  nese du réseau gastrovasculaire de la méduse *Aurelia aurita*, et dont les idées sur la morphog  nese animale m'ont beaucoup guidée au cours de cette thèse.

D'une manière générale, je suis très reconnaissante à tous les chercheurs du laboratoire Matière et Systèmes Complexes, avec qui nous avons très souvent discuté nos résultats, et dont l'aide et les conseils nous ont été très utiles dans l'avancement de nos recherches. Je leur

sais gré de leur grande implication dans la vie du laboratoire, à travers l'organisation de réunions d'équipes, de discussions d'articles, de séminaires, de cours, ou des rencontres du laboratoire à Villers sur Mer.

J'adresse toute ma gratitude aux techniciens des plateformes de microscopie électronique : David Montero pour la microscopie électronique à balayage, et Alexis Canette pour la microscopie électronique à transmission. Leur enthousiasme et leur aide pour la mise au point des méthodes de fixation ainsi que pour l'observation des échantillons ont été extrêmement précieuses.

Je remercie chaudement les ingénieurs et techniciens du laboratoire, à qui nous devons la construction des aquariums et d'une grande partie du matériel expérimental : Mathieu Receveur, Arnaud Grados, et Laurent Réa.

Je tiens à remercier les informaticiens, Jean Hubert et A-Phat Ly, qui m'ont sortie de nombreuses difficultés informatiques.

Merci aux secrétaires du laboratoire, Danielle Champeau, Lucie Bouchu, Nadine Beyer et Carole Barache, qui permettent (ou ont permis) son fonctionnement administratif au quotidien, nous ont aidées à commander le matériel expérimental et à effectuer les réservations pour les congrès et écoles d'été.

J'adresse mes remerciements aux stagiaires que nous avons accueillis dans l'équipe, et dont les travaux m'ont permis d'avancer plus rapidement dans mes recherches : Muriel Tyrman, Étienne Pillin, et Andrés Felipe Diaz Delgadillo.

Je suis particulièrement reconnaissante à Pierre-Yves Bouis, Nicolas Cagnon et à toute l'équipe de la Cité de la Mer de Cherbourg, qui nous ont beaucoup aidées à mettre au point l'élevage des méduses *Aurelia aurita* au laboratoire, et nous ont très gentiment fourni en méduses quand nous en manquions. Je remercie également Michel Hignette et l'équipe de l'aquarium de la Porte Dorée, qui nous ont conseillées pour élever les méduses. Un grand merci à Paul Galichon, qui a nourri les méduses pendant les vacances, et certains week-ends.

Ma gratitude va également à l'ENS de Lyon, qui a assuré le financement de cette thèse, les bourses Programme Interdisciplinaire de Recherche et Projet Exploratoire, et Bonus Qualité Recherche, qui nous ont permis d'acheter le matériel expérimental, notamment le microscope et la loupe binoculaire.

Je remercie l'école doctorale dans laquelle j'étais inscrite, l'ED Matière Condensée et Interfaces, son directeur Thomas Coudreau, qui était toujours disponible pour répondre à mes questions, ainsi que le CFDIP, pour l'organisation de nombreuses formations intéressantes et variées.

En sus de ce travail de thèse, j'ai eu la chance d'enseigner à l'Université Paris VII, en troisième année de licence, et je tiens à remercier les nombreux enseignants avec qui j'ai eu le plaisir de travailler, dans le cadre des TP *De la Gouttes aux Fluides, Vibrations et Ondes*, et des TD de *Physique du Solide*.

Le bon déroulement de cette thèse est très largement lié aux amitiés que j'ai pu partager avec des thésards, post-docs et stagiaires du laboratoire. Je pense à Rémy Colin, qui a toujours été disponible pour m'aider, à Amsha Proag, qui donnait des conseils scientifiques à tous les thésards qui le lui demandaient, à Anne-Florence Bitbol, Delphine Fayol, Muriel Tyrman et Pierre-Antoine Cuniasse, avec qui j'ai beaucoup aimé discuter.

Je remercie tout particulièrement mes amies Malak Safi, Li Shi, Cécilia Galindo-Gonzalez, et Cécilia Lantos. Nos repas du midi ensemble étaient un merveilleux bol d'air... J'espère de tout cœur que nous continuerons à nous voir plus tard, que vous soyez en France, aux États-Unis, en Espagne ou en Chine...

Je remercie ma famille et mes amis, qui m'ont toujours soutenue, et à qui je dois beaucoup.

Je remercie Tristan, dont l'amour m'est essentiel, et qui m'a soutenue chaque jour pour mener à bien cette thèse.

# Table des matières

Résumé .....	3
Abstract .....	4
Remerciements .....	5
Introduction .....	12
1. La méduse <i>Aurelia aurita</i> .....	18
1.1. Les cnidaires .....	18
1.2. <i>Aurelia aurita</i> : anatomie, physiologie .....	20
1.2.1. <i>Aurelia aurita</i> .....	20
1.2.2. Anatomie de la méduse <i>Aurelia aurita</i> .....	21
1.2.3. Physiologie de la méduse <i>Aurelia aurita</i> .....	22
1.2.3.1. Fonctions de relation .....	23
1.2.3.2. Fonctions de nutrition .....	24
1.2.3.3. Fonctions de reproduction .....	26
1.3. Élevage des méduses <i>Aurelia aurita</i> au laboratoire .....	32
1.3.1. Aquariums .....	32
1.3.2. Paramètres à contrôler .....	35
1.3.2.1. Qualité de l'eau .....	35
1.3.2.2. Courant .....	36
1.3.3. Strobilation et temps de séjour dans les aquariums .....	36
1.3.4. Nourrissage .....	37
1.4. Le système gastrovasculaire de la méduse <i>Aurelia aurita</i> .....	38
1.4.1. Présentation du réseau de canaux du système gastrovasculaire .....	38
1.4.1.1. Le système de canaux .....	38
1.4.1.2. Les canaux et l'endoderme .....	41
1.4.2. Les étapes de la croissance des canaux .....	42
1.4.2.1. De l'éphyrule à la méduse .....	43
1.4.2.2. Croissance des canaux de la méduse .....	45
1.4.2.3. Croissance des canaux dans l'endoderme .....	49
2. La mésoglée .....	52
2.1. Introduction .....	52
2.1.1. La matrice extracellulaire .....	52
2.1.2. Composition et rôle de la mésoglée .....	52
2.1.3. Présentation de notre étude de la mésoglée .....	53

2.2.	Structure de la mésoglée.....	54
2.2.1.	Observation par microscopie à contraste interférentiel différentiel des fibres larges....	54
2.2.1.1.	La microscopie à contraste interférentiel différentiel.....	54
2.2.1.2.	Protocole.....	55
2.2.1.3.	Observations.....	56
2.2.2.	Observation par microscopie électronique à balayage des fibres fines .....	58
2.2.2.1.	Protocole.....	58
2.2.2.2.	Observations.....	59
2.3.	Propriétés mécaniques macroscopiques de la mésoglée.....	61
2.3.1.	La rhéologie, le rhéomètre.....	61
2.3.1.1.	Quelques rappels de rhéologie.....	61
2.3.1.2.	Le rhéomètre.....	63
2.3.2.	Protocole.....	63
2.3.3.	Résultats .....	65
2.4.	Propriétés mécaniques microscopiques de la mésoglée .....	67
2.4.1.	La microrhéologie .....	67
2.4.1.1.	Principe et utilisations .....	67
2.4.1.2.	Théorie sous-jacente.....	68
2.4.2.	Protocole.....	76
2.4.2.1.	Injection.....	77
2.4.2.2.	Observations.....	79
2.4.2.3.	Analyse.....	82
2.4.2.4.	Résolution spatiale du montage expérimental.....	87
2.4.3.	Résultats .....	89
2.4.3.1.	Méduses juvéniles .....	89
2.4.3.2.	Méduses adultes .....	90
2.4.3.3.	Modules viscoélastiques aux échelles macroscopiques et microscopiques.....	91
2.4.4.	Limites de la technique et contrôles réalisés .....	92
2.4.4.1.	Limite de la technique de microrhéologie .....	92
2.4.4.2.	Expériences de microrhéologie avec des billes de polystyrène.....	94
2.4.4.3.	Expériences de microrhéologie dans des morceaux de méduses juvéniles .....	96
2.4.5.	Résumé des résultats.....	97
2.5.	Interprétation des résultats.....	97
2.5.1.	Interprétations des propriétés mécaniques de la mésoglée en lien avec sa structure.....	98
2.5.1.1.	La mésoglée et les gels de collagène .....	98
2.5.1.2.	La mésoglée aux échelles macroscopiques et microscopiques.....	99

2.5.2.	Nage de la méduse, et propriétés mécaniques de la mésoglée .....	99
2.5.3.	Vieillessement de la mésoglée .....	100
2.5.4.	Rôle de la mésoglée dans la croissance des canaux .....	101
3.	L'endoderme et les canaux.....	103
3.1.	Structure de l'endoderme et de la jonction canal/endoderme.....	103
3.1.1.	Visualisation <i>in vivo</i> par microscopie à fluorescence.....	104
3.1.1.1.	Protocole.....	104
3.1.1.2.	Résultats .....	105
3.1.2.	Visualisation <i>in vivo</i> par microscopie à contraste interférentiel différentiel .....	106
3.1.2.1.	Protocole.....	106
3.1.2.2.	Résultats .....	106
3.1.3.	Visualisation de coupes histologiques.....	109
3.1.3.1.	Principe.....	109
3.1.3.2.	Protocole.....	109
3.1.3.3.	Résultats .....	110
3.1.4.	Visualisation par microscopie électronique à balayage.....	111
3.1.4.1.	Protocole.....	111
3.1.4.2.	Résultats .....	112
3.1.5.	Visualisation par microscopie électronique à transmission.....	115
3.1.5.1.	Principe.....	115
3.1.5.2.	Protocole.....	116
3.1.5.3.	Résultats .....	118
3.2.	Croissance des canaux dans l'endoderme .....	126
3.2.1.	Visualisation <i>in vivo</i> de la croissance d'un canal .....	127
3.2.1.1.	Protocole.....	127
3.2.1.2.	Résultats .....	128
3.2.2.	Visualisation <i>in vivo</i> de l'apparition d'un canal au milieu de l'endoderme .....	132
3.2.2.1.	Protocole.....	133
3.2.2.2.	Résultats .....	133
3.2.3.	Processus de croissance d'un canal dans l'endoderme.....	136
3.2.4.	Divisions cellulaires .....	137
3.2.4.1.	Protocole.....	137
3.2.4.2.	Résultats .....	139
3.3.	Conclusion.....	142
4.	Rôle des contractions musculaires dans la croissance des canaux .....	143
4.1.	Des tissus soumis à des contraintes musculaires.....	143

4.1.1.	Structure des muscles et contractions musculaires.....	143
4.1.2.	Propriétés viscoélastiques des tissus.....	145
4.1.2.1.	L'endoderme .....	146
4.1.2.2.	L'endoderme et la mésogée.....	148
4.1.3.	Déformations induites lors des contractions.....	148
4.1.3.1.	Protocole.....	148
4.1.3.2.	Résultats .....	149
4.2.	Répartition des contraintes : modélisation par éléments finis .....	153
4.2.1.	Principe.....	154
4.2.2.	Modèle.....	154
4.2.3.	Résultats .....	158
4.3.	Application extérieure de contraintes .....	160
4.3.1.	Principe de l'expérience et matériel expérimental .....	160
4.3.2.	Protocole.....	164
4.3.3.	Résultats .....	167
4.4.	Conclusion et perspectives du chapitre .....	172
4.4.1.	Conclusion : un processus d'auto-organisation .....	172
4.4.2.	Perspectives : vers un modèle de croissance .....	173
	Conclusion et perspectives .....	178
	Bibliographie .....	181
	Annexes.....	191
A.	Techniques de visualisation.....	191
B.	Article.....	197

# Introduction

## La morphogenèse dans le vivant

La morphogenèse, du grec *morphê*, forme, et *genesis*, naissance, est l'étude de la genèse des formes. Elle correspond à l'ensemble des mécanismes expliquant l'apparition reproductible de structures et contrôlant leur forme [21].

La morphogenèse d'un organisme est l'ensemble des processus biologiques qui lui permettent d'acquérir sa forme, que ce soit lors du développement embryonnaire, au cours de la croissance, ou à l'état adulte.

Les premières études importantes exposant le rôle des processus physiques et mathématiques dans la morphogenèse dans le vivant ont été réalisées par D'Arcy Wentworth Thompson et Alan Turing. Dans 'On growth and form' [147], D'Arcy Wentworth Thompson soutient que la théorie darwinienne de l'évolution par la sélection naturelle ne permet pas à elle seule d'expliquer les formes des êtres vivants. Suite au constat que l'on peut passer d'une forme d'une espèce à la forme d'une espèce proche par certaines transformations géométriques, et après l'observation de corrélations entre des formes biologiques et des phénomènes mécaniques, il propose que la physique et la mécanique jouent un rôle majeur dans la constitution de la forme et de la structure des êtres vivants. Dans 'The chemical basis of morphogenesis' [150], Alan Turing propose un mécanisme de morphogenèse gouverné par des équations de réaction-diffusion : des substances chimiques, distribuées spatialement, diffusent et interagissent, ce qui conduit mathématiquement à l'apparition de certaines formes, les 'structures de Turing'. Il affirme également dans cet article que quelques lois physiques suffisent à expliquer de nombreux mécanismes qui déterminent la structure d'un organisme. Les équations de réaction-diffusion ont permis de décrire et de comprendre de nombreux processus de morphogenèse en biologie, de l'auto-organisation des microtubules *in vitro* [21] à la formation des motifs sur les coquillages ou sur les pelages des animaux [84]. Les nombreuses découvertes en génétique, biologie moléculaire et biochimie ont permis par la suite une compréhension beaucoup plus complète des processus de morphogenèse dans le vivant.

Ainsi, il est maintenant établi que la morphogenèse dans le vivant est gouvernée à la fois par l'information génétique, l'environnement chimique et les contraintes mécaniques, et que ces différents mécanismes de contrôle sont étroitement couplés les uns aux autres [21].

Notons que dans le vivant, la forme d'un organe est souvent étroitement liée à sa fonction. Ainsi, les formes dans le vivant se comprennent non seulement par les mécanismes biologiques, chimiques et mécaniques qui gouvernent leur apparition, mais également par les fonctions qu'elles assurent, mises en place, sélectionnées et transmises au cours de l'évolution [21].



## Cadre scientifique de notre étude

Le fil conducteur du travail présenté dans cette thèse est la compréhension des mécanismes physiques impliqués dans la morphogenèse du système gastrovasculaire de la méduse *Aurelia aurita*. Dans cette introduction, nous exposerons tout d'abord les travaux récents établissant les liens entre contraintes mécaniques et morphogenèse, puis nous situerons notre travail dans ce contexte scientifique, et enfin présenterons les étapes de notre étude.

### Contraintes mécaniques et morphogenèse

Si l'information génétique et son expression jouent un rôle crucial dans le développement des êtres vivants, expliquer la morphogenèse à partir de la seule description d'expressions génétiques et de nombreuses cascades de réactions biochimiques semble insuffisant et il apparaît de plus en plus clairement que des facteurs physiques, comme les contraintes mécaniques et les caractéristiques rhéologiques des tissus sont à considérer, pour comprendre la morphogenèse dans le vivant.

Ainsi, à l'échelle d'une cellule isolée, *in vitro*, l'environnement mécanique gouverne la différenciation cellulaire: des cellules souches cultivées sur des substrats d'élasticités variables se différencient différemment, sans l'intervention de facteurs chimiques [47-49]. Sur un substrat mou, de la consistance du cerveau, elles se différencient en neurones ; s'il est semi-rigide comme du muscle, elles donnent des cellules musculaires ; s'il est dur comme de l'os, elles deviennent osseuses [47-49]. Dans ce contexte, de nombreux travaux ont pour objectif de sonder *in vitro* l'adhésion, la migration, et la différenciation d'une cellule en réponse à des contraintes mécaniques, que ce soit par des dispositifs de rhéologie cellulaire [43,44,107,108], ou encore l'observation de l'adhésion et de la migration cellulaire sur des substrats micro-structurés, de rigidité contrôlée [88,134,135].

Parallèlement, des recherches réalisées *in vivo* montrent que les propriétés mécaniques et d'adhésion des différentes cellules jouent un rôle essentiel dans la migration cellulaire et la ségrégation des tissus lors de la morphogenèse embryonnaire [90]. De plus, l'expression de certains gènes, dits 'architectes', c'est-à-dire jouant un rôle clef très tôt dans le développement, apparaît comme une conséquence directe des contraintes locales de compression liées aux mouvements embryonnaires [51]. Ainsi, les mouvements qui donnent sa forme à l'embryon sont liés à l'expression des gènes du développement, et ces mouvements peuvent en retour influencer l'expression des gènes dans les cellules.

Le lien entre contraintes physiques appliquées localement, sur une ou plusieurs cellules, et expression génétique, peuvent être expliqués, *in vivo* comme *in vitro*, par deux mécanismes cellulaires principaux : la mécanotransduction et la mécanotransmission [5]. Lors du processus de mécanotransduction, l'information tactile est captée au niveau de la membrane et transmise par signaux moléculaires, *via* des cascades de réactions, afin d'activer l'expression

génétique appropriée. La mécanotransmission correspond elle à une transmission mécanique directe : la contrainte se transmet mécaniquement jusqu'au noyau, et la déformation de l'ADN induit l'expression génétique [74]. Cette transmission mécanique est assurée par les filaments du cytosquelette, à savoir les microtubules, les filaments d'actine et les filaments intermédiaires. Ces filaments, tels les poutres et câbles d'une construction architecturale, structurent et maintiennent la cellule (modèle de tenségrité), qui elle-même adhère à la matrice extracellulaire [72]. L'interconnexion entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette permet de transmettre les contraintes macroscopiques à l'échelle microscopique, l'échelle de la cellule [72]. Ainsi, les déformations de la matrice se transmettent aux cellules, et *vice versa*. Ces constantes interactions à l'échelle cellulaire permettent de guider la croissance, la migration, la différenciation cellulaire, et donc la morphogenèse [75].

Afin de pouvoir lier mouvements cellulaires, contraintes mécaniques et expressions génétiques lors du développement, les techniques expérimentales de visualisation et d'analyse d'images, de micromanipulation, ainsi que de marquage génétique apparaissent cruciales, et se sont considérablement développées ces dernières années. Les techniques de microscopie actuelles, couplées à des algorithmes d'analyse d'image très poussés, permettent de suivre individuellement les cellules lors du développement d'un organisme [21,52,98,105,114]. Ces techniques permettent de retracer le lignage cellulaire, d'avoir accès à des mesures quantitatives à l'échelle de la cellule [52,114], et peuvent être combinées à des mesures d'expressions génétiques dans l'embryon, dans l'espace et dans le temps [21,98]. Par ailleurs, le suivi individuel du mouvement de chaque cellule et l'étude de l'expression génétique peuvent être couplés à l'application locale *in vivo* de forces sur l'embryon (ablation laser, pinces magnétiques, micromanipulation d'une aiguille...) [45,105,124,127].

L'analyse des mouvements de morphogenèse et de leurs liens avec la mécanique peut également être réalisée sans suivi individuel de chaque cellule : le mouvement global des tissus, en lien avec leurs propriétés de viscoélasticité [156] permet d'appréhender la morphogenèse embryonnaire [17,37,54]. Parallèlement aux observations, des modèles physiques peuvent être développés, par exemple pour la modélisation de la morphogenèse pulmonaire [31,151], des vaisseaux sanguins [113], du tube gastrique [138], des tumeurs [11], ou encore des veines des feuilles [33]. Ces différentes études, parmi d'autres, montrent que la morphogenèse dans le vivant semble étroitement liée à la répartition des champs de contraintes mécaniques dans les tissus. De plus, si certains travaux présentent les processus de morphogenèse comme étant le résultat de nombreuses régulations génétiques [23], ces études proposent des modèles physiques simples, qui, *via* un nombre restreint de paramètres, permettent de rendre compte de l'émergence de formes complexes.

### **La méduse, un modèle biologique pour l'étude de la morphogenèse des systèmes branchés dans le vivant**

Dans le cadre de l'étude du rôle des facteurs physiques dans la morphogenèse d'un organisme, notre travail se rapproche plus particulièrement des travaux sur les facteurs

physiques impliqués dans le développement des structures branchées dans le vivant, comme par exemple les vaisseaux sanguins, les poumons, ou encore les veines des feuilles [55].

Dans les vaisseaux sanguins, les contraintes de cisaillement induites par l'écoulement qui les parcourt induisent des cascades de signalisation dans les jeunes cellules endothéliales, permettant la création des artères et des veines [79,89,97,110], et par la suite induisent une adaptation du diamètre des canaux au flux [36,55]. Par ailleurs, les gradients de contraintes présents dans les tissus, ainsi que la croissance des tissus entourant les vaisseaux, guident la morphogenèse vasculaire [4,113]. La morphogenèse pulmonaire ou vasculaire peut être comprise et modélisée physiquement comme une croissance dans un champ laplacien [31,113]. Enfin, la morphogenèse des veines des feuilles, grâce à une analogie entre leur géométrie et celle des réseaux de fractures, peut être modélisée physiquement comme une croissance dans un champ vectoriel, induit par des contraintes de compression isotropes au sein de la feuille, liées à la prolifération cellulaire [34,55].

Dans le cadre de cette thèse, nous avons étudié la morphogenèse d'une structure branchée particulière : le réseau gastrovasculaire de la méduse *Aurelia aurita*. Chez la méduse, le réseau gastrovasculaire est un réseau de canaux présent dans son ombrelle, et chargé de distribuer les nutriments et l'oxygène. C'est un réseau ouvert sur l'extérieur, dans lequel circule de l'eau de mer. Le système gastrovasculaire de la méduse est un modèle intéressant pour l'étude de la morphogenèse des systèmes de canaux dans le vivant. Les méduses figurent en effet parmi les premiers animaux pluricellulaires connus (elles sont apparues il y a environ 600 millions d'années). Il est dès lors possible que les mécanismes impliqués dans la morphogenèse gastrovasculaire de la méduse *Aurelia aurita* soient fondamentaux et se retrouvent chez d'autres espèces plus évoluées. Ainsi, les étapes de son développement gastrovasculaire (décrites en détail dans le premier chapitre) mettent en jeu des processus voisins du développement vasculaire des vertébrés, comme le bourgeonnement de nouveaux canaux, leur croissance, puis leur connexion au réseau de canaux existant [55]; les facteurs de croissance du système gastrovasculaire sont également proches de ceux du système vasculaire des vertébrés [140]. Par ailleurs, comme nous le verrons dans le premier chapitre, le réseau de canaux de la méduse *Aurelia aurita* est particulièrement simple, et se développe presque toujours de la même façon, surtout lors des premiers stades de croissance. Enfin, le tissu majeur de la méduse *Aurelia aurita*, à savoir la matrice extracellulaire, est quasiment transparent, ce qui permet de visualiser aisément en microscopie optique *in vivo* les structures cellulaires, et parmi elles le système gastrovasculaire, et ce sans le moindre marquage cellulaire.

### **Les processus de contrôle de la morphogenèse du système gastrovasculaire : génétiques, chimiques et mécaniques**

Comme nous l'avons vu, la morphogenèse dans le vivant est un processus complexe, qui implique des contrôles génétiques, chimiques, et mécaniques.

### ***Contrôles génétiques et chimiques***

Les méduses sont des cnidaires, embranchement qui, grossièrement, regroupe polypes, hydres et méduses (chapitre 1). Les cnidaires ont été étudiés par les généticiens, notamment pour leurs capacités de régénération. En effet, de nouvelles hydres entières et parfaitement fonctionnelles peuvent pousser à partir de morceaux du corps d'une hydre originelle [64,91]. Ces capacités de régénération sont dues au fait que les cellules épithéliales des hydres sont des cellules souches : ces cellules peuvent à la fois proliférer indéfiniment par divisions cellulaires, et se différencier en cellules spécialisées (cellules des tentacules ou du pied de l'hydre) [18,64]. Par ailleurs, les cnidaires étant des animaux dont l'organisation anatomique est primitive et particulièrement simple, les mécanismes génétiques et chimiques intervenant lors de leur développement, notamment lors de l'embryogenèse [129,141,163] ou de la strobilation [12-14,86], ont été très étudiés. Ces mécanismes, ainsi que les gènes responsables du développement, ont été comparés en détail avec ceux d'autres organismes, afin d'étudier leur évolution [19,80,81].

Dans le cadre de notre travail de recherche sur la morphogenèse du système gastrovasculaire, et parmi les nombreuses études de génétique menées sur le développement des cnidaires, nous nous sommes notamment intéressé aux travaux portant sur les protéines associées à la croissance vasculaire. Ainsi, Seipel et al. mirent en évidence l'existence d'analogues aux 'Vascular Endothelial Growth Factor' (VEGF) et 'Vascular Endothelial Growth Factor Receptor' (VEGFR), dans la méduse *Podocoryne carnea* [140]. Le VEGF est une protéine de croissance particulièrement importante dans la formation des vaisseaux sanguins chez les vertébrés. Les récepteurs au VEGF, les VEGFR, sont localisés à la surface des cellules endothéliales, et permettent de stimuler la prolifération et la migration cellulaires, ainsi que la formation de tubes. Seipel et al. montrèrent qu'une protéine proche du VEGF est associée à la formation des structures tubulaires dans la méduse : les tentacules, ainsi que les canaux du système gastrovasculaire [140].

### ***Contrôles mécaniques***

Comme nous l'avons vu précédemment, l'expression génétique ne suffisant pas à expliquer le développement des organismes, des facteurs physiques, comme les propriétés mécaniques des tissus, sont à prendre en compte pour comprendre la morphogenèse. Chez les cnidaires, Kraus montra que la morphogenèse embryonnaire est guidée à chaque stade par des informations épigénétiques, telles que la structure spatiale de l'embryon, ou la distribution des contraintes mécaniques au sein de l'embryon [85].

Les processus physiques impliqués dans la morphogenèse du système gastrovasculaire de la méduse, n'ont, à notre connaissance, pas encore été étudiés.

## Plan de notre étude

Dans le cadre de cette thèse, qui est essentiellement expérimentale, nous avons cherché à mettre en rapport le développement des canaux du système gastrovasculaire avec les propriétés mécaniques des tissus de la méduse, ainsi que les contraintes qu'ils subissent.

Dans le chapitre 1, nous introduisons plus précisément le sujet. Nous exposons dans un premier temps l'anatomie, le cycle de vie et le développement de la méduse, puis les techniques d'élevage en laboratoire. Nous terminons par la présentation du système gastrovasculaire de la méduse *Aurelia aurita*, ainsi que par la description des observations dont nous nous sommes proposées de rendre compte. Nous concluons sur la nécessité d'étudier les propriétés rhéologiques et le rôle mécanique des différents tissus entourant les canaux du système gastrovasculaire, à savoir la mésoglée, l'endoderme et les muscles.

Dans le chapitre 2, nous exposons notre étude de la mésoglée : de ses propriétés viscoélastiques, ainsi que de sa structure, aux échelles macroscopiques et microscopiques. S'il est apparu que les propriétés mécaniques de la mésoglée ne semblent pas jouer un rôle direct dans la morphogenèse gastrovasculaire, nous avons pu mettre en évidence et décrivons un phénomène de vieillissement de la mésoglée, en lien avec les contraintes physiques qu'elle subit.

Dans le chapitre 3, nous nous intéressons en détail à la structure de l'endoderme, afin de comprendre quels processus cellulaires sont impliqués dans la croissance du système gastrovasculaire.

Dans le chapitre 4, nous décrivons dans un premier temps les contraintes et déformations subies par les différents tissus lors des contractions musculaires. Nous présentons ensuite une modélisation numérique simple de la répartition des contraintes de compression lors des contractions musculaires, ainsi que les premiers résultats d'une expérience d'application de forces externes sur les tissus. Les résultats de ces expériences, joints à ceux présentés dans les chapitres précédents, permettent de discuter du rôle que semblent jouer les contraintes induites par les contractions musculaires dans la morphogenèse du système gastrovasculaire.

Enfin, nous concluons notre étude, et présentons les expériences qui pourraient être conduites dans le futur, ainsi que les perspectives ouvertes par ce travail de recherche.

# 1. La méduse *Aurelia aurita*

## 1.1. Les cnidaires

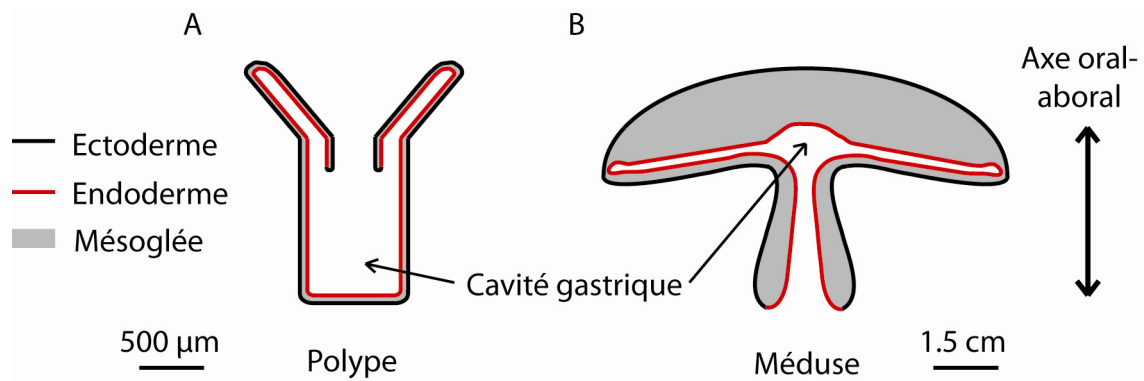
Les méduses sont apparues sur Terre il y a environ 600 millions d'années et figurent parmi les premiers animaux pluricellulaires connus. Il existe actuellement plusieurs centaines d'espèces de méduses. Les méduses sont des cnidaires. Les cnidaires, qui sont regroupés dans l'embranchement *Cnidaria* du règne animal, sont des espèces animales aquatiques possédant des cellules urticantes caractéristiques : les cnidocytes. Plus de 10 000 espèces de cnidaires sont connues.

Les cnidaires sont des animaux particulièrement simples : ils sont formés à partir de deux feuillets cellulaires embryonnaires seulement, l'endoderme et l'ectoderme ; ce sont des organismes diploblastiques. Les animaux plus évolués sont triploblastiques : l'embryon s'organise en trois feuillets embryonnaires au cours de la gastrulation, l'endoderme, l'ectoderme et le mésoderme. Chez les cnidaires, les deux feuillets cellulaires endodermiques et ectodermiques sont séparés par un tissu connectif gélatineux : la mésoglée [9]. Notons toutefois que certaines structures des cnidaires pourraient être d'origine mésodermique [141,142].

L'embranchement *Cnidaria* se subdivise en plusieurs classes : les antozoaires, les staurozoaires, les cubozoaires, les scyphozoaires, et les hydrozoaires [9].

Les cnidaires existent sous deux formes : les formes fixées, ou polypes (comme par exemple les coraux, ou les anémones de mer) et les formes libres, ou méduses. Les méduses sont des animaux plutôt solitaires, se déplaçant librement dans l'eau, au gré des courants ; elles mènent une vie pélagique. Elles ont une forme typique en cloche, avec la bouche dirigée vers le bas. Elles présentent une importante couche de mésoglée. Les polypes vivent souvent en colonie, fixés à un support, comme un rocher, un coquillage, une algue... ; ils mènent une vie benthique. Ils ont une forme typique cylindrique, avec la bouche dirigée vers le haut. Leur couche de mésoglée est fine [16].

Qu'ils soient sous la forme polype ou méduse, les cnidaires peuvent être vus grossièrement comme un 'sac gastrique' ouvert sur le milieu extérieur (l'eau de mer). La surface interne de ce sac est constituée de cellules endodermiques, et la surface externe de cellules ectodermiques. La mésoglée occupe l'espace entre ces deux feuillets cellulaires [16] (figure 1.1).



**Figure 1.1** – Représentation schématique et simplifiée de l'anatomie du polype et de la méduse en coupe longitudinale, le long de l'axe oral-aboral. À gauche (A) : polype. À droite (B) : méduse.

En général, le cycle de vie des cnidaires présente une alternance entre formes polype et méduse [9,16].

Les polypes peuvent se reproduire de manière asexuée, par clonage : ils produisent des stolons, à partir desquels bourgeonnent de nouveaux polypes. Ils forment alors des colonies. Ils peuvent également se transformer pour donner naissance à des méduses. Ce processus est appelé strobilation: des sillons annulaires apparaissent sur le polype, qui finit par ressembler à une 'pile d'assiettes'. Chaque 'assiette' est une larve de méduse, appelée éphyrule. Les éphyrules, par des contractions actives, se détachent l'une après l'autre du corps du polype, puis grandissent et deviennent des méduses adultes. Les colonies de polypes femelles (respectivement mâles) donnent naissance à des méduses femelles (respectivement mâles). Les méduses adultes se reproduisent de manière sexuée : les mâles libèrent leurs spermatozoïdes dans l'eau ; les femelles conservent leurs ovules dans leur estomac, et absorbent les spermatozoïdes portés par les courants marins. La fécondation a lieu dans l'estomac de la femelle. Les œufs donnent naissance à des larves, appelées planula. Les planula sont recouvertes de cils, qui leur permettent de nager, jusqu'à pouvoir se fixer sur une algue ou un rocher. Les planula se transforment alors en polypes. Et le cycle recommence...

Notons toutefois que ce cycle de vie typique peut présenter quelques variantes, d'une espèce à l'autre [16]: chez certaines espèces de scyphozoaires, le stade polype est inexistant, et les méduses adultes donnent naissance directement à de nouvelles méduses; les anthozoaires, eux, n'ont pas de stade méduse, et les polypes se reproduisent de manière sexuée ; enfin, chez certaines espèces d'hydrozoaires, les méduses restent fixées aux polypes et assurent la reproduction sexuée.

Dans la suite de ce manuscrit, nous nous intéresserons en détail à *Aurelia aurita*, qui, comme la plupart des scyphozoaires, suit ce cycle de vie typique (décrit en détail au paragraphe 1.2.3.3.).

Ainsi, de nombreuses espèces de cnidaires peuvent se reproduire à la fois de manière asexuée sous la forme polype, et de manière sexuée sous la forme méduse. Ce double mode de reproduction assure aux cnidaires une importante capacité reproductive. Par ailleurs, la coexistence des formes polype et méduse leur permet de résister à la prédation : peu de prédateurs s'attaquent à la fois aux formes libres et fixées. Enfin, ils peuvent occuper de nombreuses niches écologiques : les fonds marins peuvent être colonisés par les polypes, et les pleines eaux par les méduses.

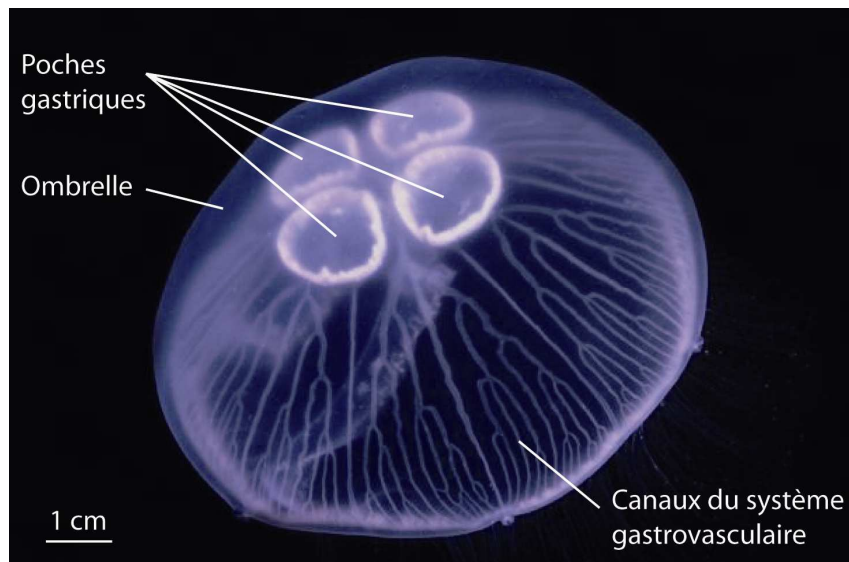
## **1.2. *Aurelia aurita* : anatomie, physiologie**

Ce travail de thèse a été consacré à l'étude de la morphogenèse du système gastrovasculaire de la méduse *Aurelia aurita*. Le présent chapitre est consacré à l'anatomie, à la physiologie, et au cycle de vie d'*Aurelia aurita*, dont la description est indispensable à la compréhension des études menées.

### **1.2.1. *Aurelia aurita***

*Aurelia aurita*, aussi appelée méduse Aurélie, ou méduse lune, est un cnidaire, de la classe des scyphozoaires, ordre Semeostomeae, famille Ulmaridae [133]. La méduse *Aurelia aurita* est très commune, et cosmopolite [96,133]. Présente dans presque tous les océans et mers de la planète, elle affectionne les eaux tropicales et tempérées. Elle nage généralement près de la surface, ou en très faible profondeur, solitaire ou en groupes. On peut la rencontrer en pleine mer ou près des côtes. Elle dérive au gré des courants, avec le plancton, et peut s'échouer sur les rivages. Elle est reconnaissable à son aspect translucide, à son ombrelle d'une dizaine de centimètres de diamètre, parcourue par le réseau de canaux du système gastrovasculaire, et à ses quatre poches gastriques en forme de fer à cheval en son centre (figure 1.2). Comme la plupart des scyphozoaires, elle présente une symétrie tétraradiale.





**Figure 1.2** – La méduse *Aurelia aurita* (extrait de [152]).

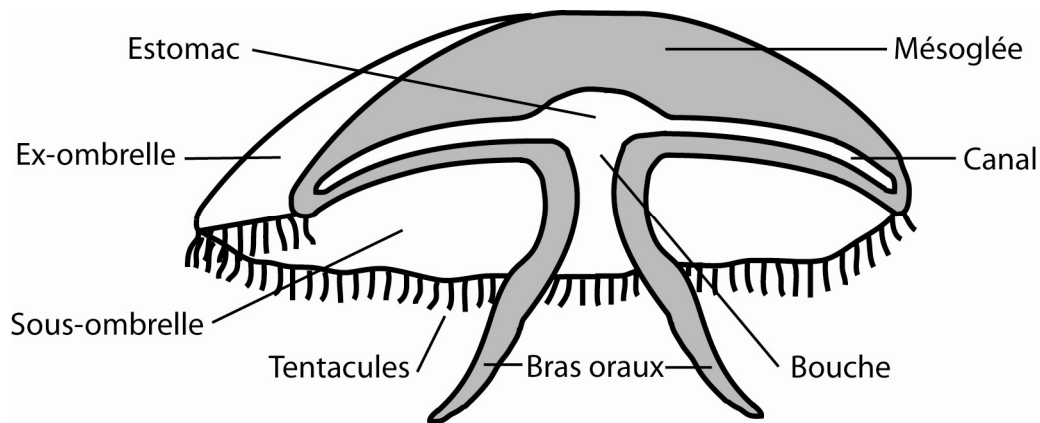
### 1.2.2. Anatomie de la méduse *Aurelia aurita*

Comme décrit précédemment, les méduses peuvent être vues grossièrement comme un ‘sac gastrique’ ouvert sur le milieu extérieur (l’eau de mer). La surface interne de ce sac est constituée de cellules endodermiques, et la surface externe de cellules ectodermiques. La mésoglée occupe l’espace entre ces deux feuillets cellulaires. Précisons cette description sommaire [16] (figure 1.3).

Le ‘sac gastrique’ est appelé système gastrovasculaire. Ce système comprend l’estomac, au centre de la méduse, et un réseau de canaux, situé dans l’ombrelle de la méduse. L’estomac est en contact direct avec la bouche, située au centre de l’ombrelle. La bouche est encadrée par quatre bras oraux. L’ombrelle de la méduse est entourée par de nombreux tentacules. Ces dernières, très urticantes, permettent d’attraper la nourriture, qui s’accumule sur le pourtour de l’ombrelle. Les bras oraux viennent alors chercher la nourriture, et l’amener à la bouche, connectée à l’estomac. La nourriture est digérée dans l’estomac, puis distribuée dans l’ombrelle *via* le réseau de canaux. Le système gastrovasculaire est ouvert sur le milieu extérieur. Il est donc rempli d’eau de mer. L’eau de mer, ainsi que les nutriments, circulent dans les canaux grâce aux mouvements de battements des cils des cellules ciliées qui tapissent les canaux. Les cellules constituant le système gastrovasculaire sont de type endodermique.

Les cellules ectodermiques sont présentes sur la surface externe de la méduse. L’ectoderme est couvert de cellules urticantes et de cellules ciliées, permettant d’attraper la nourriture et de l’amener au bord de l’ombrelle, où elle sera récupérée par les bras oraux. La partie inférieure de l’ombrelle est couverte d’un réseau de cellules nerveuses et de fibres musculaires, permettant à la méduse de se contracter pour nager. La partie supérieure de l’ombrelle est appelée ex-ombrelle, et la partie inférieure sous-ombrelle.

La mésoglée occupe l'espace entre l'ectoderme et le système gastrovasculaire. La mésoglée est constituée d'un réseau de fibres et d'un gel amorphe de macromolécules gorgé d'eau. En volume, la mésoglée forme le tissu principal de la méduse. Chez *Aurelia aurita*, la mésoglée contient des cellules distribuées de manière éparse entre les fibres, et isolées les unes des autres. Notons que chez de nombreuses espèces de méduses, la mésoglée ne contient aucune cellule [143]. La mésoglée est responsable de la transparence de la méduse. Principal tissu de la méduse, elle est constituée essentiellement d'eau, ce qui explique que la méduse soit à 95% composée d'eau. Le reste correspond aux fibres, aux protéines et aux différents types cellulaires.



**Figure 1.3** – Schéma de l'anatomie de la méduse *Aurelia aurita*.

### 1.2.3. Physiologie de la méduse *Aurelia aurita*

Après cette description sommaire des structures principales de la méduse *Aurelia aurita*, nous estimons nécessaire de décrire plus précisément quelques détails anatomiques et types cellulaires importants. Pour faciliter la compréhension, nous avons pris le parti de les décrire en relation avec leur fonction. Nous décrirons les principaux processus physiologiques, correspondant aux fonctions de relation (locomotion et fonctions sensorielles), de nutrition et de reproduction [9,16,96,133].

### 1.2.3.1. Fonctions de relation

#### Fonctions de locomotion

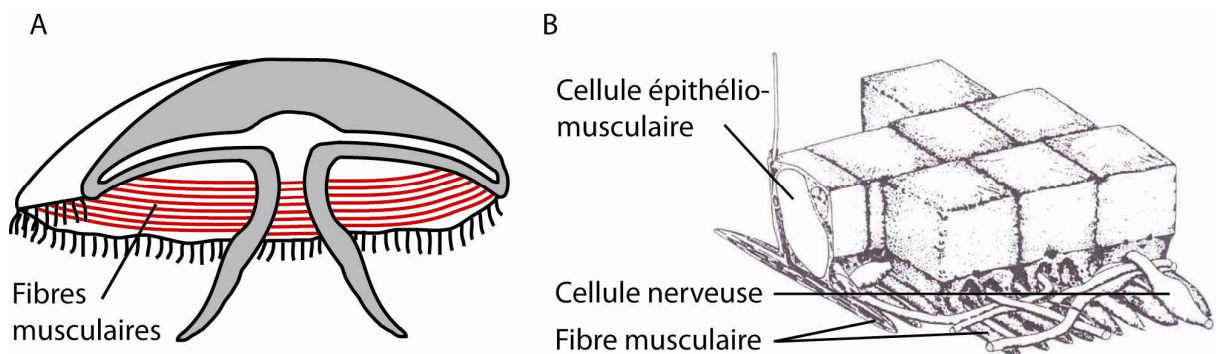
Les méduses nagent dans l'eau, afin de collecter la nourriture, d'échapper aux prédateurs, et d'interagir lors de la reproduction.

*Aurelia aurita* nage par des contractions rapides et rythmiques de ses muscles. Chaque contraction expulse l'eau sous la cloche formée par l'ombrelle, et pousse la méduse en avant. Cette forme élémentaire de propulsion est appelée hydropropulsion [38,60].

Les muscles permettant la nage sont situés au niveau de l'épiderme de la sous-ombrelle. Ces muscles ont une structure striée [137] et forment une large bande annulaire, située à la périphérie de l'ombrelle (figure 1.4). Les fibres musculaires sont constituées de cellules épithéliomusculaires : ces cellules assurent à la fois la fonction de feuillet épidermique, et d'organe musculaire [8,9].

Afin que les fibres musculaires se contractent simultanément, un système de cellules nerveuses coordonne l'action des cellules épithéliomusculaires [66]. Ces cellules nerveuses sont des neurones bipolaires qui forment un réseau parcourant toute la surface de la sous-ombrelle [8,65].

La figure suivante (figure 1.4) représente l'organisation du feuillet de cellules épithéliomusculaires chez la méduse *Cyanea capillata* [8]. Les cellules épithéliomusculaires sont jointives, de forme cubique. Les myofibrilles, qui sont les unités contractiles des muscles, sont situées à leur base. Le réseau de cellules nerveuses, en contact direct avec les myofibrilles, circule entre les cellules épithéliomusculaires.



**Figure 1.4** – Structures musculaires chez la méduse. À gauche (A) : structure annulaire des fibres musculaires chez *Aurelia aurita*. À droite (B) : structure du feuillet de cellules épithéliomusculaires chez la méduse *Cyanea capillata* (extrait de [8]).

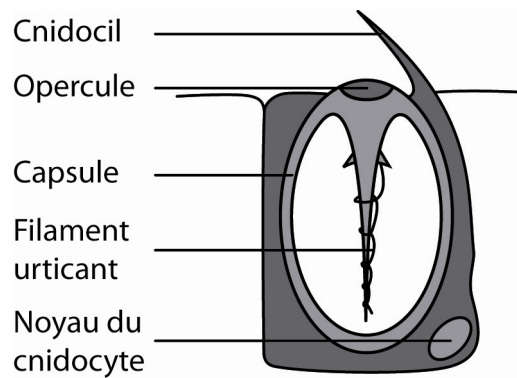
Ainsi, *Aurelia aurita* possède une large bande annulaire de muscles striés, située sur la partie inférieure de son ombrelle. Ces muscles sont constitués d'une couche d'une seule cellule d'épaisseur. La méduse ne possède pas de muscles antagonistes. Lors de la nage, son anneau musculaire se contracte puis se relâche périodiquement. Après chaque contraction musculaire, la méduse retrouve sa forme initiale grâce aux propriétés mécaniques de la mésoglée : cette dernière se déforme élastiquement à chaque contraction musculaire, et retrouve sa forme initiale quand les muscles se relâchent. Une fine couche de mésoglée, d'environ 200  $\mu\text{m}$  d'épaisseur, est située entre les muscles et le système gastrovasculaire. Cette couche est suffisamment solide pour permettre au feuillet épithéliomusculaire de s'ancrer solidement aux fibres de la mésoglée et suffisamment élastique pour se déformer de manière réversible à chaque contraction musculaire. Une épaisse couche de mésoglée, de l'ordre d'un centimètre d'épaisseur chez la méduse adulte (de 10 cm de diamètre), est située entre le système gastrovasculaire et l'épithélium de l'ex-ombrelle. Cette épaisse couche mésogléenne se déforme élastiquement à chaque contraction et assure le rôle d'antagoniste musculaire [26,60,106].

### Fonctions sensorielles

Les contractions musculaires sont commandées par des potentiels d'action circulant dans le réseau de cellules nerveuses. Ces potentiels d'action sont générés par des centres de contrôle nerveux, eux-mêmes en relation directe avec les organes sensoriels. Ces organes sensoriels sont situés au niveau des rhopaliums, des structures en forme de bâtonnets de 100  $\mu\text{m}$  de longueur. Ces rhopaliums, habituellement au nombre de huit, sont situés sur le pourtour de l'ombrelle de la méduse. Chaque rhopalium regroupe des cellules sensibles à la lumière, au toucher et à des stimuli chimiques. Les organes sensoriels permettent notamment à la méduse de ressentir la direction de la gravité et de s'orienter en fonction. Ainsi, chaque rhopalium contient une poche de cristaux (le statocyste), qui peut ou non appuyer sur des cellules sensibles au toucher en fonction de l'orientation de la méduse par rapport à la verticale. Ces cellules sensibles peuvent stimuler le réseau nerveux et commander des contractions musculaires susceptibles de modifier l'orientation de la méduse.

#### ***1.2.3.2. Fonctions de nutrition***

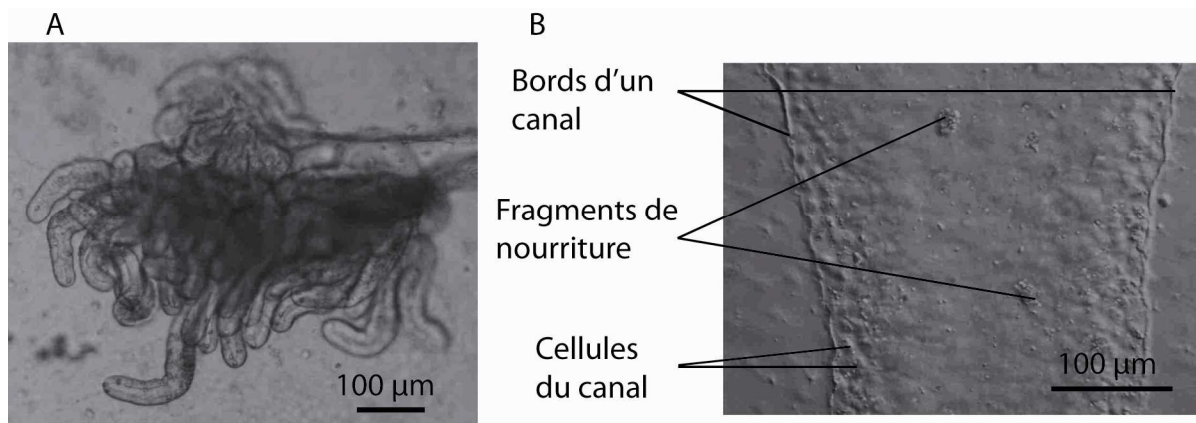
Les méduses se nourrissent de petites proies (œufs de poissons, larves de crevettes...), de zooplancton, ou de substances organiques dissoutes. Elles tuent leurs proies grâce à des cellules particulières, propres aux cnidaires : les cnidocytes. Ces cellules, au contact d'une proie, injectent une substance urticante. Chaque cnidocyte contient une capsule renfermant un filament urticant (figure 1.5). Lorsque le cnidocil est excité par contact, le filament urticant est libéré et se plante dans la proie, tel une flèche empoisonnée.



**Figure 1.5** – Schéma d'un cnidocyte (extrait de [112]).

La proie, une fois tuée, est engluée à la surface de la méduse dans du mucus. Elle est ensuite dirigée vers le bord de l'ombrelle de la méduse grâce à l'action des cellules ciliées qui tapissent la peau de la méduse. La nourriture s'accumule dans des 'poches de nourriture' situées sur le pourtour de l'ombrelle, puis est récupérée par les bras oraux et amenée à la bouche en remontant les bras oraux grâce à des cellules ciliées. La nourriture est ensuite digérée dans les quatre poches gastriques (figure 1.2). Les nombreux filaments gastriques (figure 1.6), qui tapissent les quatre poches gastriques, assurent un brassage mécanique de la nourriture. Conjointement, des enzymes sont sécrétées, permettant une digestion chimique. La nourriture digérée est distribuée dans le réseau de canaux du système gastrovasculaire (figure 1.6). Les fragments de nourriture, de même que l'eau qui les entoure, circulent grâce aux cellules ciliées qui tapissent les parois des canaux. La digestion est ensuite intracellulaire, au sein des cellules gastrovasculaires qui forment le pourtour des canaux. Les déchets sont évacués par la bouche. Dans les canaux, une double circulation particulière permet la distribution des nutriments et l'évacuation des déchets : sur la moitié supérieure des canaux, la nourriture circule de l'estomac vers le bord de l'ombrelle, et sur la moitié inférieure, elle circule en sens inverse [59,146]. La circulation complète d'un fragment de nourriture non digéré par les cellules des canaux met environ 20 minutes [16]. Les fragments de nourriture non digérés sont ainsi ramenés dans les poches gastriques puis éliminés par la bouche.

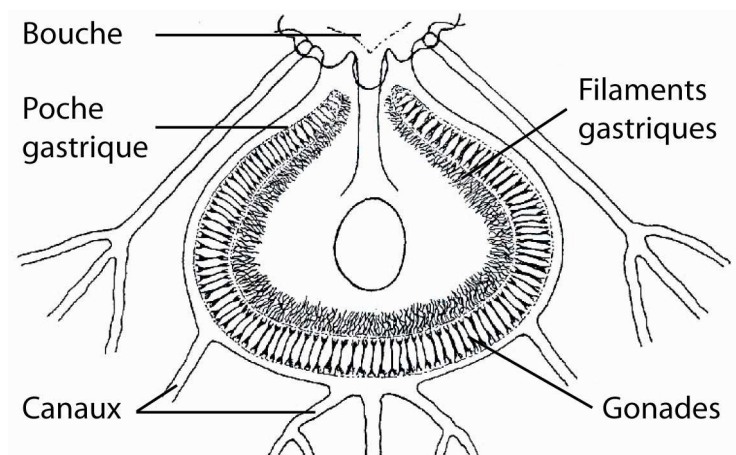
Conjointement à la nourriture, la circulation d'eau de mer dans les canaux permet la distribution d'oxygène. La méduse ne dispose d'aucun organe spécialisé pour la respiration. La respiration se fait par diffusion : les tissus sont extrêmement hydratés, et l'oxygène de l'eau diffuse directement dans les cellules, qui rejettent ensuite dans l'eau le dioxyde de carbone.



**Figure 1.6** – Visualisation d’organes gastriques. À gauche (A) : des filaments gastriques. À droite (B) : un canal, dans lequel circulent des fragments de nourriture.

### 1.2.3.3. Fonctions de reproduction

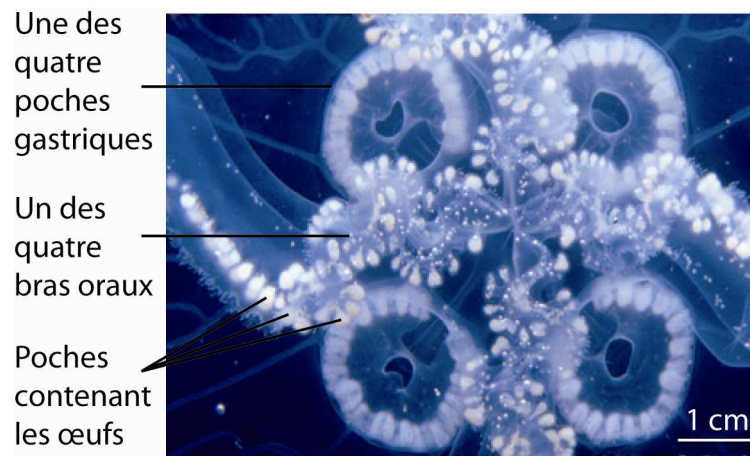
Les méduses se reproduisent de façon sexuée. Les mâles et femelles ne présentent pas de différences morphologiques apparentes. Les gonades, testicules ou ovaires, sont dans les quatre poches gastriques, à proximité des filaments gastriques (figure 1.7). Les cellules des gonades sont d’origine endodermique.



**Figure 1.7** – Représentation schématique d’une poche gastrique, contenant les gonades (extrait de [133]).

Les spermatozoïdes sont produits par les testicules dans les poches gastriques, puis sont libérés dans l’eau par la bouche. Les ovules, produits par les ovaires, restent dans les poches gastriques jusqu’à la fécondation. Les femelles absorbent les spermatozoïdes présents dans

l'eau, et la fécondation a lieu dans les poches gastriques. Les œufs restent un temps accrochés aux bras oraux de la femelle, qui les nourrit (figure 1.8).



**Figure 1.8** – Visualisation des poches contenant les œufs au niveau des bras oraux (extrait de [92]).

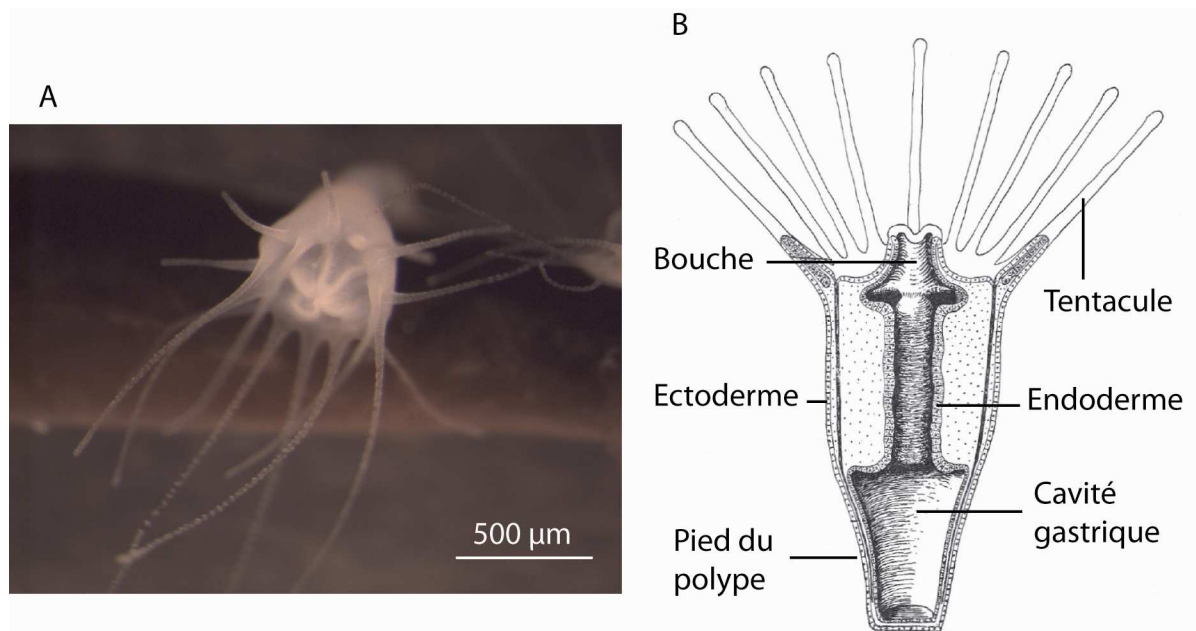
Les œufs se développent : les cellules se divisent, jusqu'à donner une boule de cellules appelée morula. La morula devient ensuite une sphère creuse remplie d'eau, formée d'un pavage monocouche de cellules : la blastula. La gastrulation transforme la blastula en gastrula. Cette dernière peut être vue comme une poche, dont les cellules externes sont de type ectodermique et les cellules internes de type endodermique. L'ectoderme se couvre ensuite de cils : la gastrula devient une planula (figure 1.9). La femelle libère les planula, qui se déposent au fond de la mer. La planula perd ses cils, se fixe au substrat, et se transforme en polype.



**Figure 1.9** – Visualisation d'une planula (extrait de [122]).



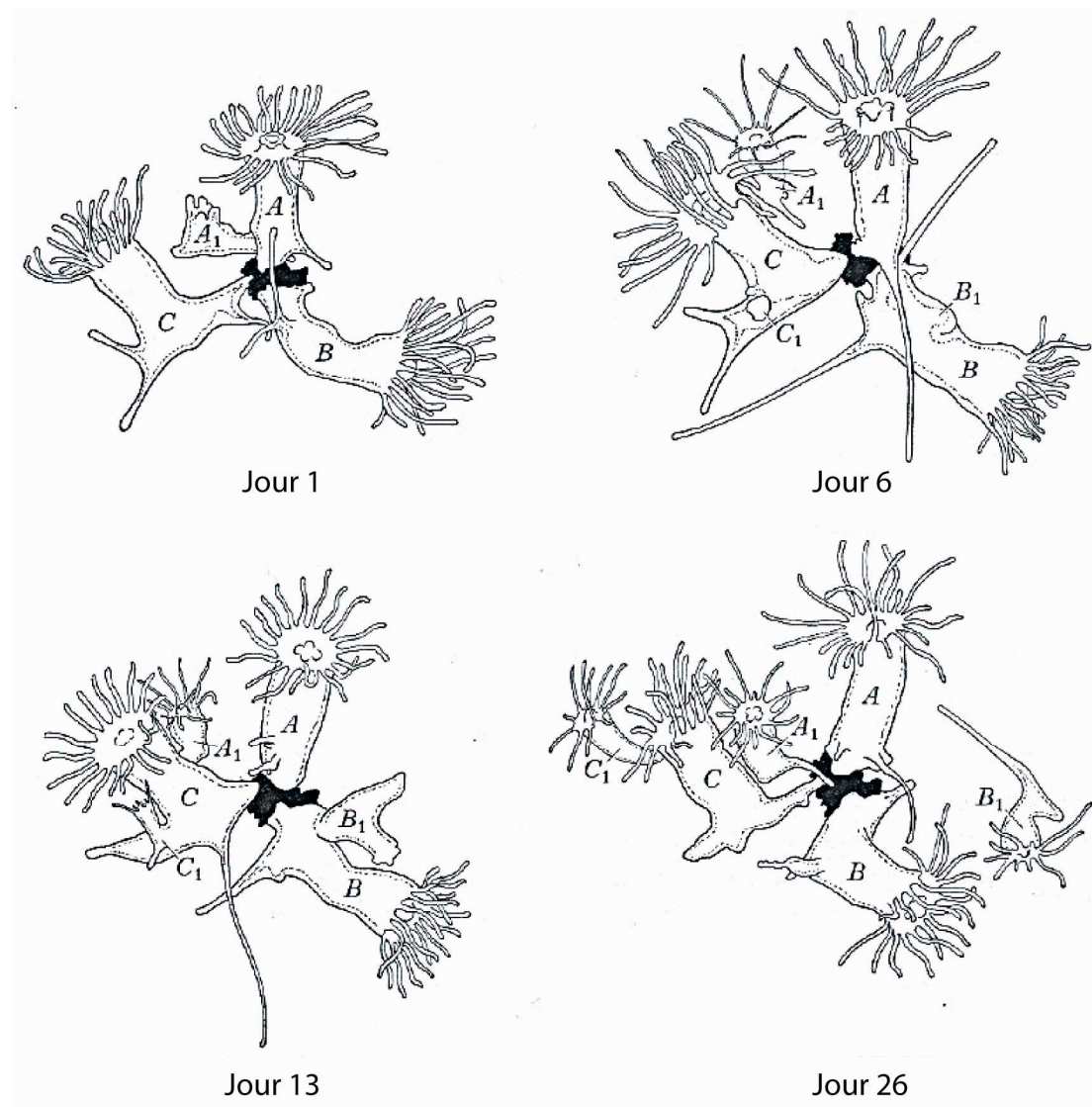
Le polype peut être vu schématiquement comme un cylindre, dont une extrémité est fixée sur un support (disque pédieux) et l'autre ouverte sur l'extérieur (figure 1.10). Elle constitue la bouche du polype, entourée de tentacules urticants. Le polype a une taille de quelques millimètres.



**Figure 1.10** – Le polype d'*Aurelia aurita*. À gauche (A) : visualisation d'un polype ; la bouche et les tentacules sont au premier plan. À droite (B) : schéma d'une coupe longitudinale de polype (extrait de [133]).

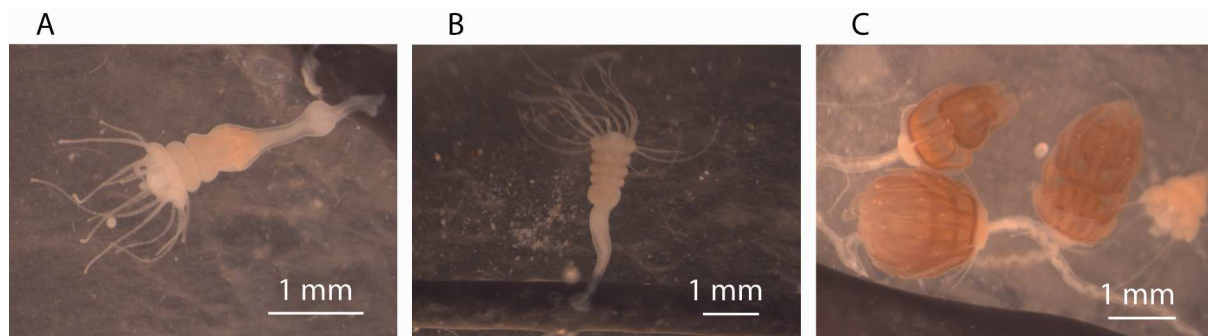
Les polypes se reproduisent de façon asexuée : un nouveau polype peut apparaître par bourgeonnement du corps du polype initial, ou bourgeonner à partir de stolons émis à la base du polype initial. Par la suite, le nouveau polype se développe et se détache du polype initial, dont il est un clone. Les polypes forment alors des colonies de clones (figure 1.11).



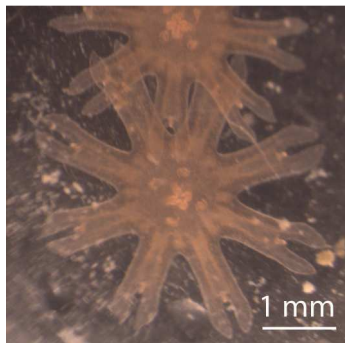


**Figure 1.11** – Reproduction asexuée par bourgeonnement des polypes d'*Aurelia aurita*. Les polypes ont été suivis au cours du temps (extrait de [133]).

Les polypes peuvent également se transformer pour donner naissance à des méduses. Ce processus est appelé strobilation [14,120], et dure environ un mois. Le corps du polype se divise par une série de constriction transverses, le polype perd ses tentacules, les constriction transverses se creusent progressivement, et le polype finit par ressembler à une 'pile d'assiettes empilées' (figure 1.12). Chaque 'assiette' est une larve de méduse, une éphyrule. Les éphyrules ont une forme d'étoile, majoritairement à 8 branches [14], et ont une taille de quelques millimètres (figure 1.13). Les éphyrules, par des contractions actives, se détachent l'une après l'autre du corps du polype, puis, en quelques mois, grandissent et deviennent des méduses adultes. Après avoir libéré toutes ses éphyrules (de l'ordre d'une dizaine), le pied du polype se développe et les tentacules réapparaissent, pour redonner un polype complet [120]. Ce polype pourra alors à nouveau donner naissance à de nouveaux polypes et à des éphyrules.



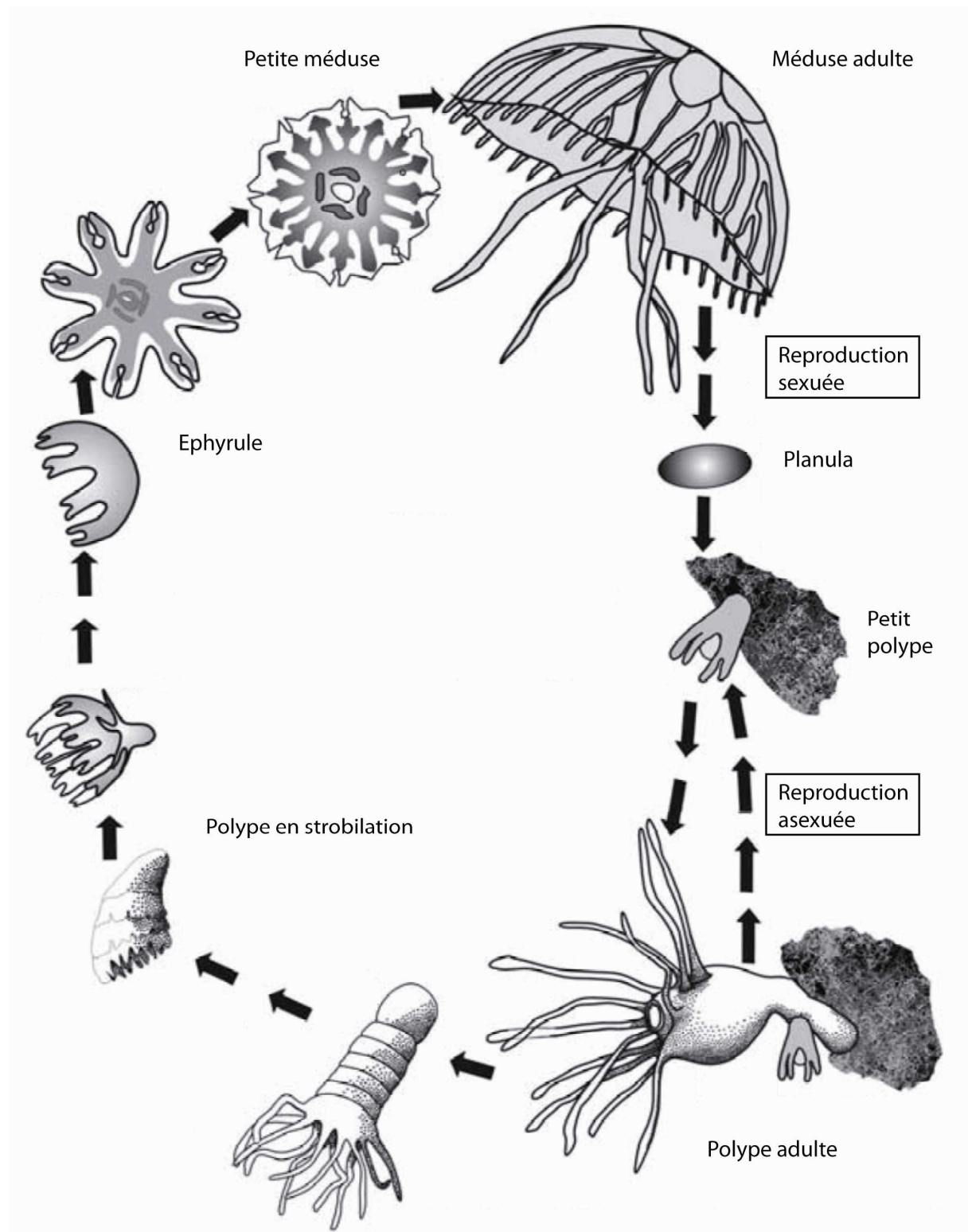
**Figure 1.12** – Visualisation de différents stades de strobilation de polypes d'*Aurelia aurita*. À gauche (A) et au milieu (B) : polypes présentant des constrictions transverses. À droite (C) : éphyrules prêtes à se détacher des polypes.



**Figure 1.13** – Visualisation d'éphyrules d'*Aurelia aurita*.

La strobilation est un phénomène dépendant de nombreux facteurs, comme la température, la quantité de nourriture, l'intensité lumineuse, la concentration en iode... [13,86,133]. Dans la nature, les polypes présentent un pic de strobilation en hiver. Au laboratoire, la strobilation des polypes est provoquée par une diminution brutale de la température de l'eau [86]. Dans la mer, les éphyrules naissent ainsi majoritairement en hiver, puis grandissent et deviennent des méduses adultes en été [133]. Ces méduses se reproduisent, les planula se fixent au fond de l'eau, se transforment en polypes. Ces polypes bourgeonnent en automne, puis donnent naissance à de nouvelles éphyrules en hiver [133].

Le cycle de vie complet est représenté sur la figure suivante (figure 1.14).



**Figure 1.14** – Cycle de vie d'*Aurelia aurita* (extrait de [96]).

Après cette présentation d'*Aurelia aurita* et de son cycle de vie, et avant d'introduire plus en détail notre étude sur son système gastrovasculaire, nous souhaitons présenter le système d'aquariums développé lors de ma thèse. Il nous a permis d'élever les méduses au laboratoire et de disposer en permanence d'animaux à différents stades de développement.

### 1.3. Élevage des méduses *Aurelia aurita* au laboratoire

En collaboration avec la Cité de la Mer de Cherbourg, où Pierre-Yves Bouis, Nicolas Cagnon et toute l'équipe élèvent des méduses, nous avons mis en place un système d'aquariums pour élever *Aurelia aurita* au laboratoire : avec l'aide de Matthieu Receveur, nous avons construit des aquariums pour les polypes, les éphyrules, les méduses adultes, un circuit pour assurer un courant d'eau dans les aquariums, un circuit de filtration et de refroidissement de l'eau, et nous avons adapté les protocoles d'élevage de méduses de la Cité de la Mer à notre installation.

#### 1.3.1. Aquariums

L'aquarium pour les polypes est une simple boîte en verre remplie d'eau de mer artificielle (figure 1.15). Les polypes sont accrochés à des coquillages ou des morceaux de plastique, recouverts d'algues, suspendus dans l'aquarium. Une petite pompe crée un léger courant dans l'aquarium. L'eau est à température ambiante (de 21°C à 25°C suivant les saisons).



**Figure 1.15** – Photo de l'aquarium pour polypes.

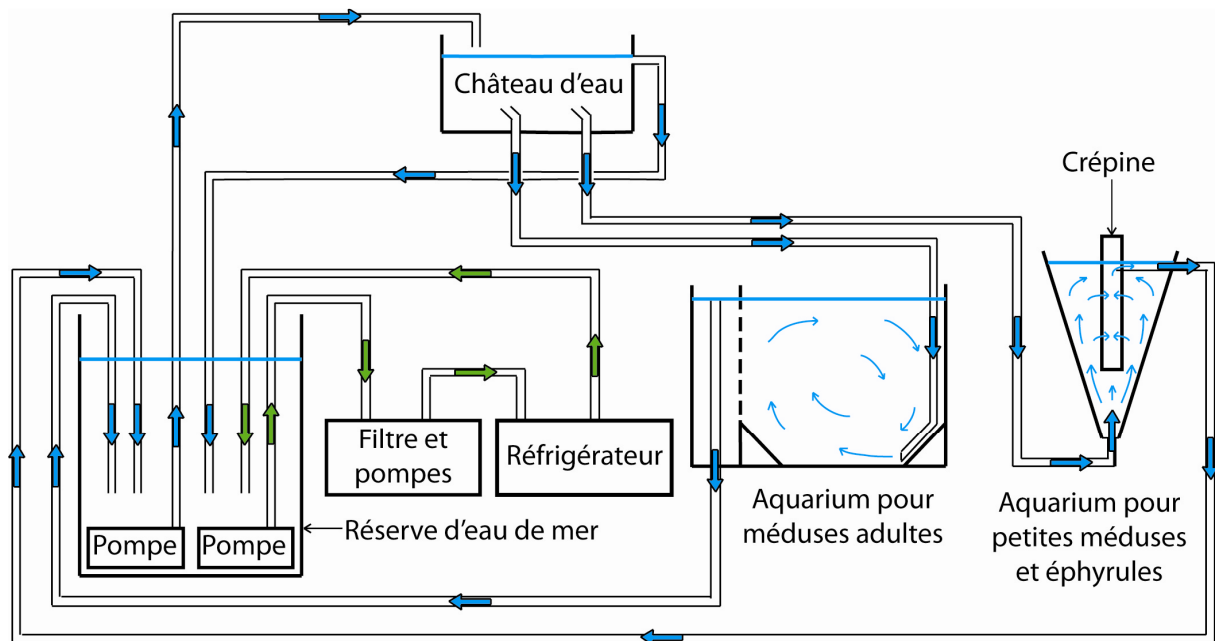
Les aquariums pour éphyrules et méduses sont plus complexes. En effet, pour bien se développer, elles doivent nager dans un courant d'eau très contrôlé, une eau de bonne qualité,



et une température constante d'environ 20°C. Pour satisfaire ces conditions, nous avons construit l'installation photographiée et schématisée sur les figures suivantes (figures 1.16 et 1.17).



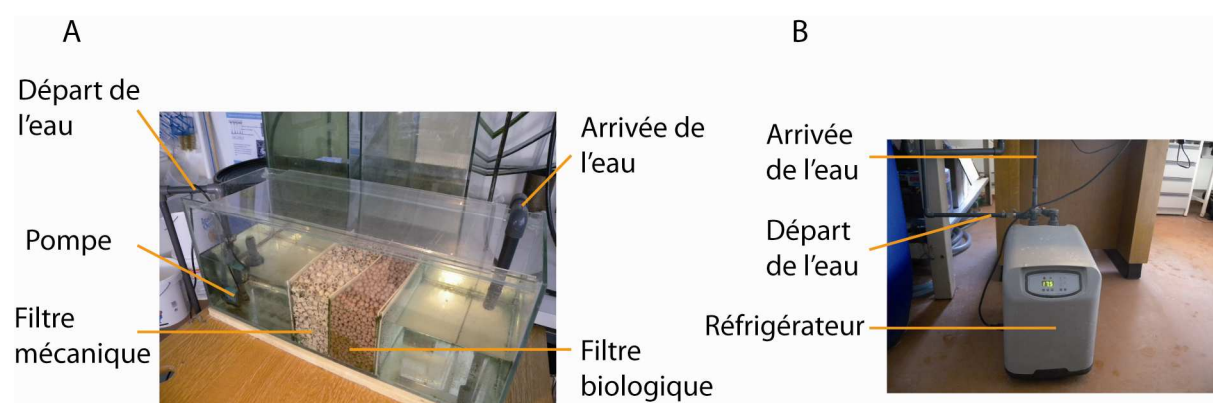
**Figure 1.16** – Photo de l'installation permettant l'élevage des méduses au laboratoire.



**Figure 1.17** – Schéma de la circulation de l'eau dans les aquariums.

De la réserve d'eau de mer partent deux circuits. Le premier, représenté par des flèches vertes, permet la filtration et le refroidissement de l'eau. Le second, représenté par des flèches bleues, permet le renouvellement de l'eau ainsi que l'établissement d'un courant d'eau permanent dans les aquariums. La réserve d'eau de mer (figures 1.16 et 1.17) contient environ 100 L d'eau. Ce grand volume d'eau, par l'inertie qu'il confère à l'installation, permet d'éviter que la qualité de l'eau de mer varie trop brusquement dans le temps.

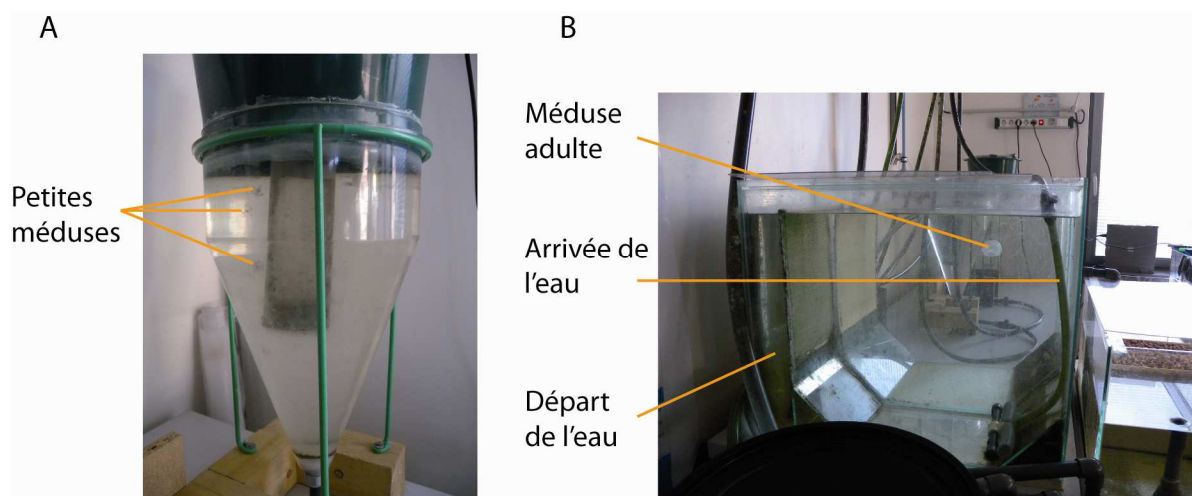
Décrivons le premier circuit. Une pompe (pompe NEW-JET NJ3000) placée au fond de la réserve d'eau de mer envoie l'eau dans le filtre (figures 1.17 et 1.18 A), qui assure une filtration à la fois mécanique et biochimique. Le filtre mécanique capture les poussières et débris en suspension et le filtre biochimique permet une dégradation biologique des déchets (ce processus est détaillé dans le paragraphe 1.3.2.1.). L'eau est ensuite pompée depuis le filtre jusqu'au réfrigérateur (réfrigérant pour aquarium TECO TR20), qui permet de maintenir l'eau à une température de 20°C dans les aquariums (figures 1.17 et 1.18 B).



**Figure 1.18** – Photos du circuit de refroidissement et de filtration. À gauche (A) : photo du filtre. À droite (B) : photo du réfrigérateur.

Décrivons le second circuit. Une seconde pompe (pompe NEW-JET NJ3000), placée au fond de la réserve d'eau de mer, envoie l'eau dans le château d'eau (figures 1.16 et 1.17). L'eau dégringole ensuite depuis le château d'eau jusque dans les aquariums coniques pour éphyrules et petites méduses (figures 1.16, 1.17 et 1.19 A), et dans les grands aquariums pour méduses adultes (figures 1.16, 1.17 et 1.19 B). Le château d'eau permet d'avoir une pression d'eau parfaitement constante et contrôlée en amont des aquariums. Le débit d'eau à la sortie du château d'eau est ajustable en amont de chacun des aquariums grâce à des vannes. Le château d'eau dispose d'un système de trop-plein, qui renvoie l'eau dans la réserve d'eau de mer. L'eau, une fois parvenue dans les aquariums, traverse des filtres, puis rejoint la réserve d'eau de mer par un système de trop-plein. Les trop-pleins sont en effet séparés des aquariums par des filtres (crépine pour les aquariums coniques, grillage pour les aquariums pour méduses adultes), afin d'éviter que les méduses, qui suivent les courants d'eau, ne s'engouffrent dans

les trop-pleins (figures 1.17 et 1.19). Le château d'eau et les aquariums coniques ont une contenance de l'ordre de 10 à 20 L, et les aquariums pour méduses adultes de l'ordre de 60 L.



**Figure 1.19** – Photos des aquariums. À gauche (A) : photo de l'aquarium pour petites méduses et éphyrules. À droite (B) : photo de l'aquarium pour méduses adultes.

### 1.3.2. Paramètres à contrôler

Certains paramètres doivent être tout particulièrement contrôlés, à savoir la qualité de l'eau de mer artificielle ainsi que le courant.

#### 1.3.2.1. Qualité de l'eau

L'eau de mer artificielle est obtenue en diluant 40 g de sel synthétique (Instant Ocean) par litre d'eau osmosée. On obtient une salinité autour de 40, mesurée avec un réfractomètre. On contrôle les taux de nitrates ( $\text{NO}_3^-$ ), nitrites ( $\text{NO}_2^-$ ), et d'ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ), le pH et la quantité d'oxygène dissous. Le pH doit être autour de 8, la quantité d'oxygène dissous autour de 6 à 8 mg/L. Le taux d'ammonium ne doit pas excéder 0.1 mg/L, le taux de nitrite 0.1 mg/L, et le taux de nitrate 10 mg/L. L'ammonium n'est pas dangereux en tant que tel, mais l'ammoniac, qui est sa base conjuguée, détruit les muqueuses. Les nitrites induisent la mort des poissons par suffocation. Les nitrates peuvent être tolérés à une concentration plus importante que l'ammoniac et les nitrites, mais sont nocifs à trop forte concentration. Par ailleurs, comme décrit dans le paragraphe suivant, un fort taux de nitrate est le signe que l'eau est trop 'vieille' et doit être changée.

Une eau qui vient d'être fabriquée respecte ces standards. Cependant, la décomposition des excès de nourriture et des déchets provenant des méduses altère chaque jour un peu plus la

qualité de l'eau. Notamment, le taux de nitrate augmente. Les déchets organiques des aquariums contiennent des dérivés azotés (acides aminés, protéines, acides nucléiques...). Les bactéries transforment ces déchets en ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) et ammoniac ( $\text{NH}_3$ ). Certaines espèces de bactéries, comme les *Nitrosomonas*, oxydent l'ammoniac en nitrites ( $\text{NO}_2^-$ ). D'autres, comme les *Nitrobacter*, oxydent les nitrites en nitrates ( $\text{NO}_3^-$ ). Ces bactéries colonisent le filtre biologique du filtre, qui est composé d'un grand nombre de petites billes poreuses. Les nitrates sont partiellement assimilés par les algues qui se développent sur les parois des aquariums. Pour éviter que le taux de nitrate ne dépasse le seuil et maintenir une bonne qualité de l'eau, l'eau est régulièrement renouvelée, comme indiqué dans le paragraphe suivant.

Tous les jours, les parois des aquariums coniques sont nettoyées, afin d'enlever les restes de nourriture. Les aquariums pour méduses adultes et l'aquarium pour les polypes sont eux nettoyés tous les mois. Ces opérations de nettoyage, qui se font par siphonage, induisent une baisse quotidienne de la quantité d'eau dans la réserve d'eau de mer. Pour à la fois compenser cette perte d'eau et assurer le renouvellement de l'eau, environ 10 L d'eau 'neuve' sont déversés chaque semaine dans la réserve d'eau de mer. Marie-Alice Guédeau-Boudeville nous a beaucoup aidé à renouveler l'eau régulièrement.

#### **1.3.2.2. *Courant***

S'il n'y avait aucun courant d'eau dans les aquariums, les éphyrules et méduses, qui sont d'assez mauvaises nageuses, stagneraient au fond des aquariums et finiraient par mourir. Pour se développer et grandir correctement, elles ont besoin d'être entraînées par un courant d'eau. Il doit être suffisant pour maintenir les éphyrules et méduses au milieu des aquariums. Mais il ne doit pas être trop fort, car alors le débit d'eau à travers les filtres de sortie deviendrait trop important et les animaux s'écraseraient sur les filtres.

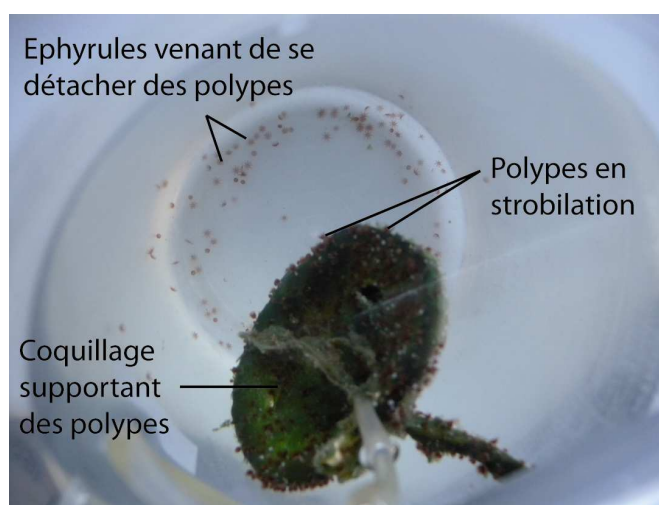
Les directions et le sens des lignes de courant dans les différents aquariums sont représentés par des flèches bleues sur la figure 1.17. La forme des aquariums est ajustée pour obtenir un certain profil de courant : circulaire dans les aquariums pour méduses adultes et quasi vertical dans les aquariums pour éphyrules et petites méduses. Les méduses adultes tournent en rond doucement, et les éphyrules et petites méduses sont soulevées par un léger courant ascendant.

#### **1.3.3. Strobilation et temps de séjour dans les aquariums**

Le système d'élevage permet de disposer en permanence de méduses à différents stades de développement. En effet, tous les 20 jours, un coquillage supportant de nombreux polypes est transféré de l'aquarium à polypes dans un bécher, placé au réfrigérateur à 10°C. Ce choc thermique provoque la strobilation des polypes [13]: environ 6 semaines après avoir subi le choc thermique, de nombreuses éphyrules naissent (figure 1.20). Les naissances des éphyrules



s'étalent sur environ 2 semaines. Le coquillage supportant les polypes est ensuite remis dans l'aquarium pour polypes, où il restera au moins 3 mois, avant d'être à nouveau transféré au réfrigérateur. Les éphyrules, après leur naissance, sont transférées dans les aquariums coniques. Elles y grandissent, jusqu'à devenir de petites méduses, en environ 1 mois. Quand ces dernières atteignent une taille de l'ordre de 3 cm de diamètre, elles sont transférées dans les aquariums pour méduses adultes, où elles grandissent, jusqu'à ce que le diamètre de leur ombrelle soit de l'ordre de 10 cm, ce qui nécessite environ 6 mois. Elles ont une durée de vie de l'ordre d'1 an. De nouveaux polypes étant transférés au réfrigérateur tous les 20 jours, nous récoltons de nouvelles éphyrules quasiment tous les jours, ce qui nous permet de disposer en permanence de toutes les tailles de méduses dans nos aquariums.



**Figure 1.20** – Photos de polypes en strobilation après un choc thermique, et d'éphyrules venant de se détacher de ces polypes.

#### 1.3.4. Nourrissage

Les polypes, éphyrules et méduses sont nourris tous les jours en semaine, et un jour sur deux le week-end et lors des vacances. Ils sont nourris avec des larves de crevettes, des artemias (*Artemia salina*, Ocean Nutrition, Belgique). Avant d'être données aux méduses, les larves d'artemia sont elles-mêmes nourries pendant 24 h par une soupe de poisson très riche, le SELCO (Ocean Nutrition, Belgique), afin d'augmenter leur pouvoir nutritif.

Après cette présentation de la méduse *Aurelia aurita* et de l'installation qui nous a permis d'élever cet animal au laboratoire, nous pouvons entrer plus en détail dans le cœur de notre sujet : la morphogenèse du réseau gastrovasculaire de la méduse *Aurelia aurita*. Nous commencerons par décrire l'anatomie du système gastrovasculaire, puis présenterons les étapes de sa croissance, depuis l'éphyrule jusqu'à la méduse adulte. Enfin, nous présenterons quels paramètres pourraient contrôler cette croissance, et introduirons le problème scientifique.

## 1.4. Le système gastrovasculaire de la méduse *Aurelia aurita*

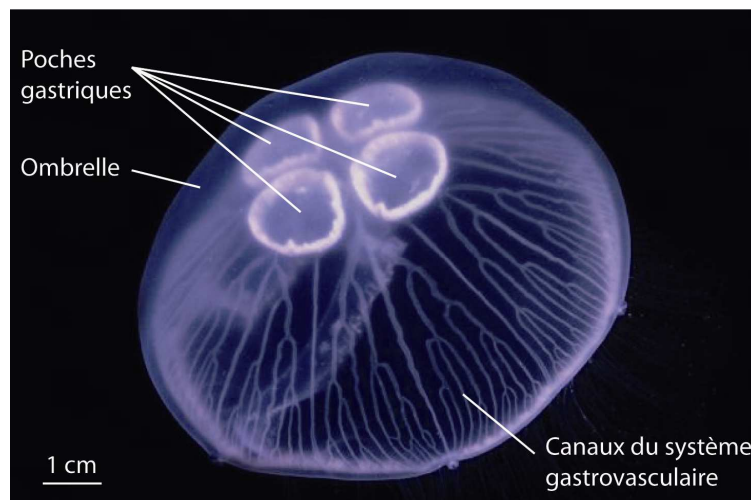
Le système gastrovasculaire permet la digestion de la nourriture ainsi que la distribution des nutriments et de l'oxygène dans l'ombrelle de la méduse. Il est composé des quatre poches gastriques au centre de la méduse (présentées au paragraphe 1.2.3.2.), et d'un réseau de canaux, situé dans l'ombrelle [9,16,133,146]. Nous nous intéressons au développement de ce réseau de canaux.

### 1.4.1. Présentation du réseau de canaux du système gastrovasculaire

#### 1.4.1.1. Le système de canaux

##### Présentation

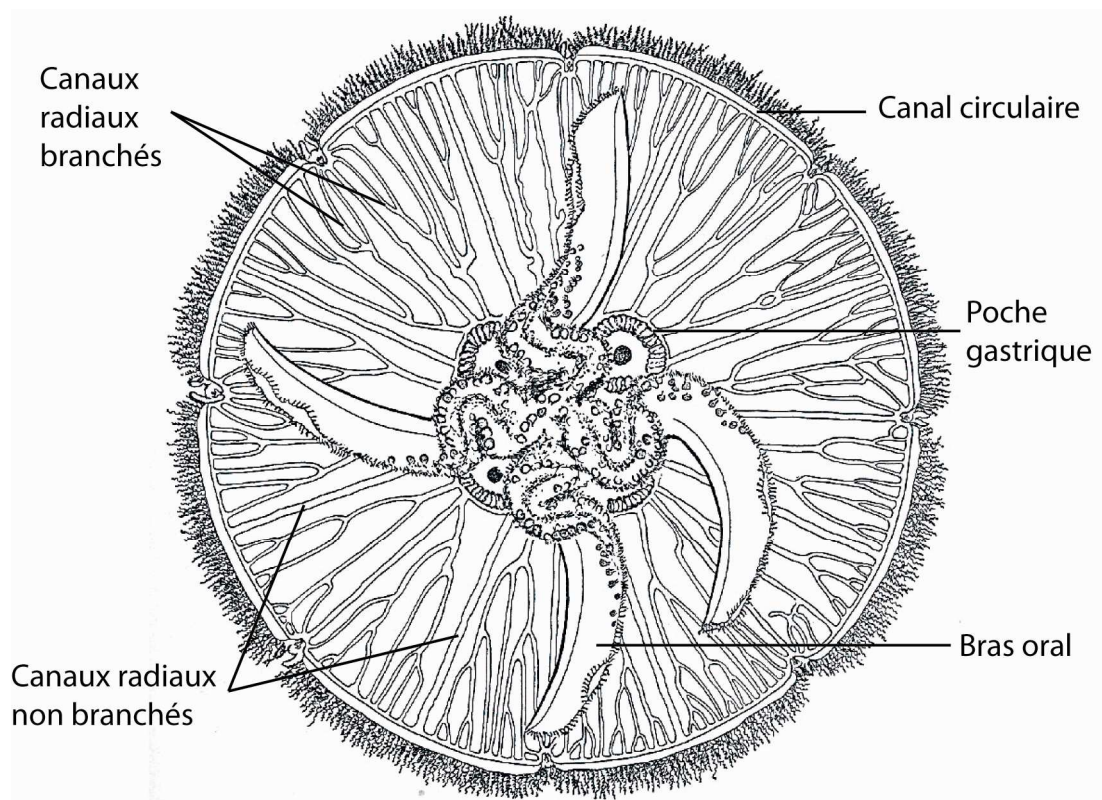
Le système de canaux est présent dans l'ombrelle de la méduse, comme on le voit sur la figure suivante (figure 1.21).



**Figure 1.21** – Visualisation des canaux du système gastrovasculaire de la méduse *Aurelia aurita* (extrait de [152]).

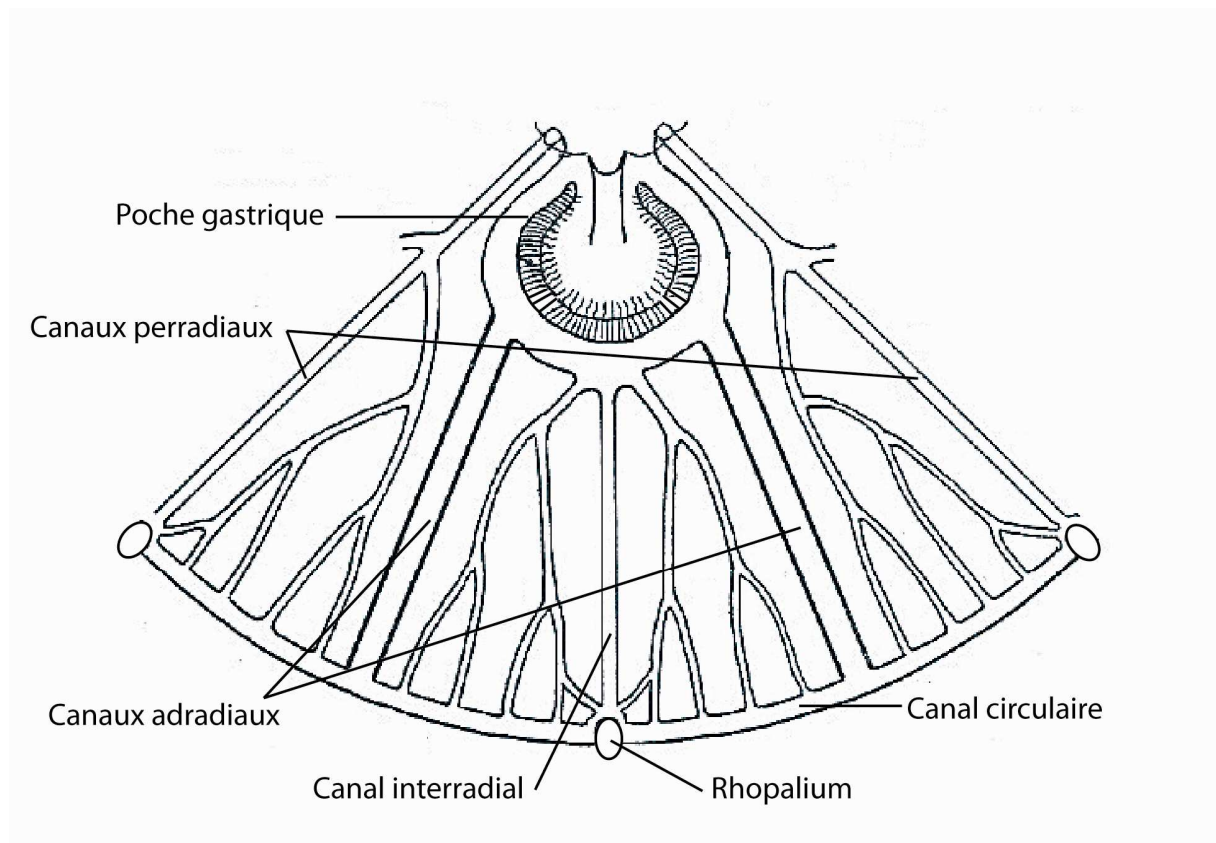
Ces canaux traversent la mésoglée. Ils sont toutefois beaucoup plus proches de la partie inférieure de l'ombrelle (sous-ombrelle) que de la partie supérieure (ex-ombrelle) : la couche de mésoglée qui sépare les canaux de la peau inférieure est beaucoup plus fine que la couche de mésoglée qui sépare les canaux de la peau supérieure (épaisseur de 200  $\mu\text{m}$  pour l'une et 5 mm pour l'autre, chez la méduse adulte) [9,16,133,146].

Le système de canaux peut être visualisé en retournant la méduse, est en regardant la sous-ombrelle, dont il est très proche. Il est représenté sur la figure suivante (figure 1.22). Nous pouvons observer que les canaux sont en connexion directe avec les poches gastriques au centre de la méduse. Nous pouvons distinguer des canaux radiaux, alternativement branchés (avec des bifurcations) et non branchés (tout droits), et un canal circulaire, qui fait le tour de l'ombrelle [133,146].



**Figure 1.22** – Schéma des canaux du système gastrovasculaire de la méduse *Aurelia aurita* (extrait de [133]).

Détaillons la structure des canaux sur une représentation schématique d'un quart d'ombrelle (figure 1.23). Nous observons que d'une poche gastrique partent deux canaux non branchés, appelé canaux adradiaux, et un réseau de canaux branchés appelés canaux interradiaux. Le canal interr radial principal est relié à un des 8 rhopaliums (centres des organes sensoriels, présentés précédemment au paragraphe 1.2.3.1.). Entre les poches gastriques, part un réseau de canaux branchés, appelés canaux perradiaux. Le canal perradial principal est relié à un rhopalium. Comme la méduse a quatre poches gastriques, elles a donc 8 canaux adradiaux, 4 réseaux de canaux interradiaux et 4 réseaux de canaux perradiaux. Ainsi, les 8 canaux non branchés alternent avec les 8 réseaux de canaux branchés (interradiaux et perradiaux), connectés aux 8 rhopaliums.



**Figure 1.23** – Schéma de l'organisation des canaux du système gastrovasculaire de la méduse *Aurelia aurita* (extrait de [133]).

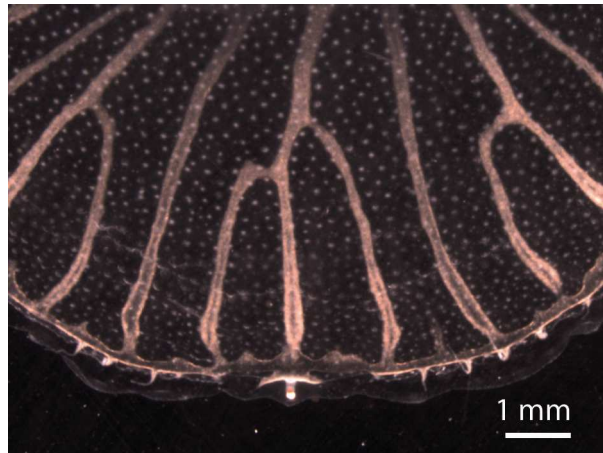
### Visualisation

Le réseau de canaux de la méduse *Aurelia aurita* peut être visualisé par la technique de 'shadowgraph imaging', qui permet d'augmenter les contrastes, et de rendre visibles les irrégularités d'un matériau transparent, comme l'est la méduse. La figure 1.25 A est une image d'une portion de l'ombrelle d'une méduse, visualisée par la technique de 'shadowgraph' (annexe A). Les canaux sont très clairement visibles.

Les canaux peuvent également être visualisés directement à la loupe binoculaire (Leica, Z16 APO). Mais dans cette situation, le contraste n'est en général pas suffisant. Il doit être augmenté en réalisant l'observation après que la méduse ait mangé. En effet, comme indiqué dans la partie précédente, les méduses sont nourries par des artemias. Ces animaux sont orangés, et colorent l'ensemble du système gastrovasculaire de la méduse en orange après ingestion. Cette couleur finit par disparaître après que la digestion soit finie. Un bon contraste peut être obtenu en observant les méduses entre une et deux heures après l'ingestion d'artemias.

La figure suivante montre une photo du type d'image obtenue (figure 1.24).



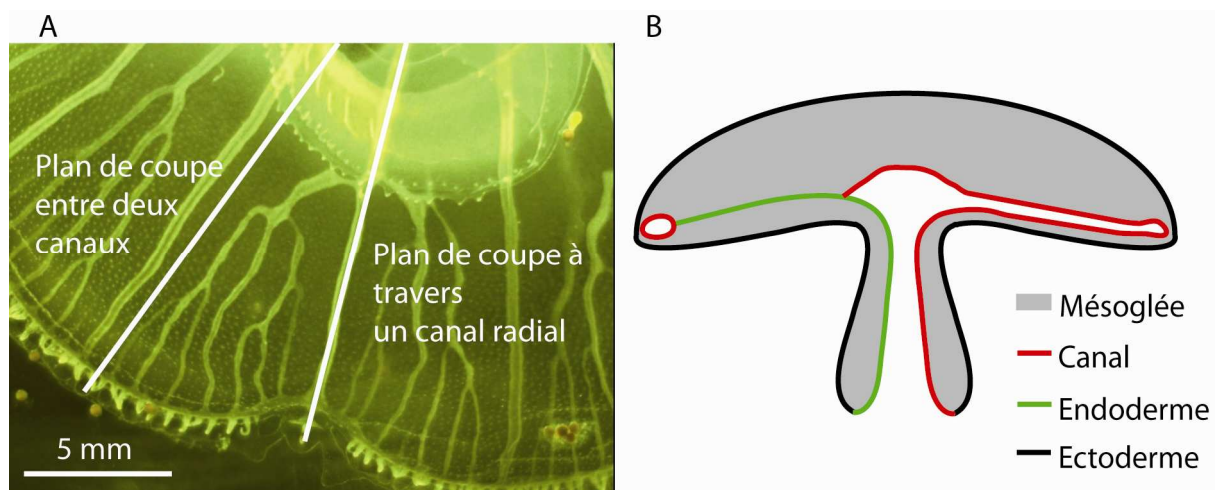


**Figure 1.24** – Visualisation des canaux, colorés par les artemias, à la loupe binoculaire.

#### 1.4.1.2. Les canaux et l'endoderme

Il est crucial de noter que les canaux ne sont pas de simples tubes entourés de mésoglée. Ils sont en fait également entourés d'un mince feuillet de cellules : l'endoderme [25,159,160]. Les figures suivantes permettent de comprendre la structure de l'endoderme.

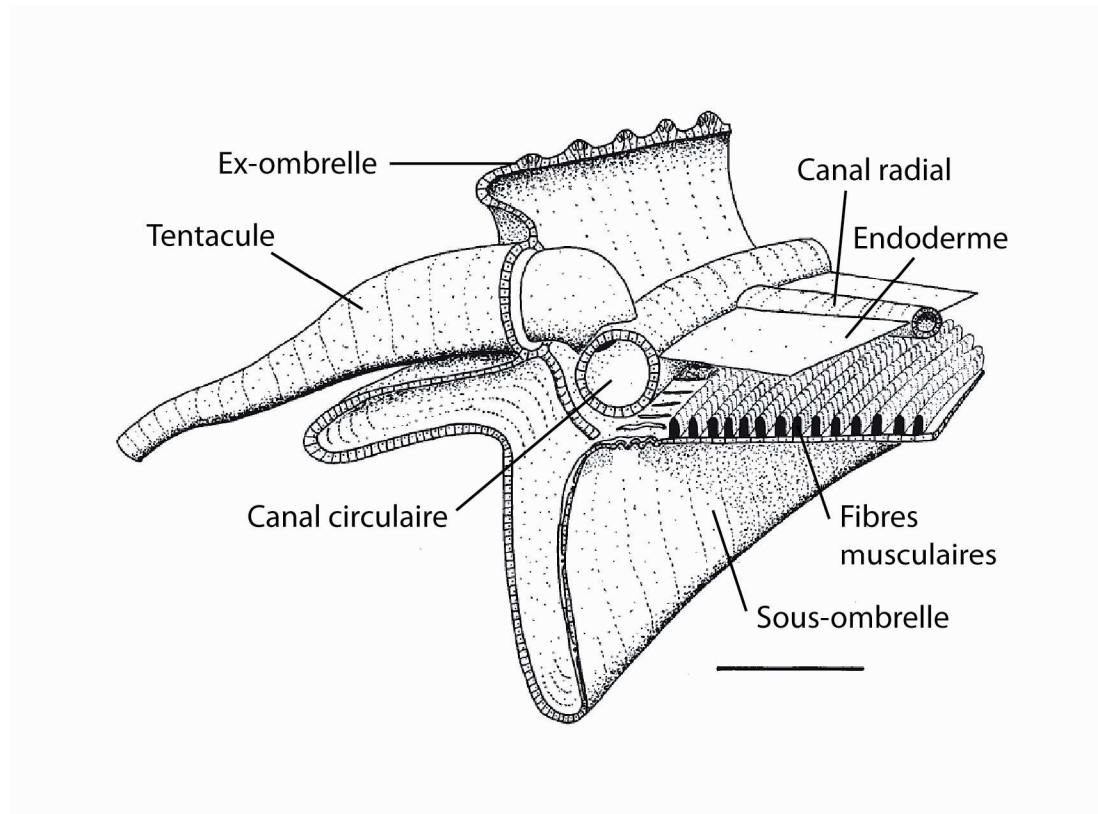
La figure suivante présente une vue schématique d'une coupe longitudinale de la méduse (figure 1.25 B). Les plans de coupe sont indiqués par des traits blancs sur la figure 1.25 A, réalisée par Vincent Fleury : la coupe a été faite à droite à travers un canal radial non branché, et à gauche entre deux canaux.



**Figure 1.25** – Schéma d'une coupe d'une méduse. À gauche (A) : les deux plans de coupe indiqués sur une méduse visualisée par la technique de 'shadowgraph'. À droite (B) : coupe longitudinale de la méduse.

Sur le schéma de coupe longitudinale, le cercle rouge à gauche correspond à la coupe longitudinale du canal circulaire. L'endoderme est représenté en vert. Vu du dessus, l'endoderme est un mince feuillet plat de cellules. Ce feuillet relie entre eux tous les canaux : à la jonction entre un canal et l'endoderme, les cellules des parois des canaux sont directement connectées aux cellules de l'endoderme (nous présenterons en détail notre étude de la jonction canal/endoderme dans le chapitre 3).

Le schéma suivant représente la structure du bord de l'ombrelle d'*Aurelia aurita*, et permet de visualiser l'allure de l'endoderme (figure 1.26).



**Figure 1.26** – Schéma de l'anatomie du bord de l'ombrelle d'*Aurelia aurita* (extrait de [25]).

Nous montrerons des images de l'endoderme dans la partie suivante, qui traite de la croissance des canaux.

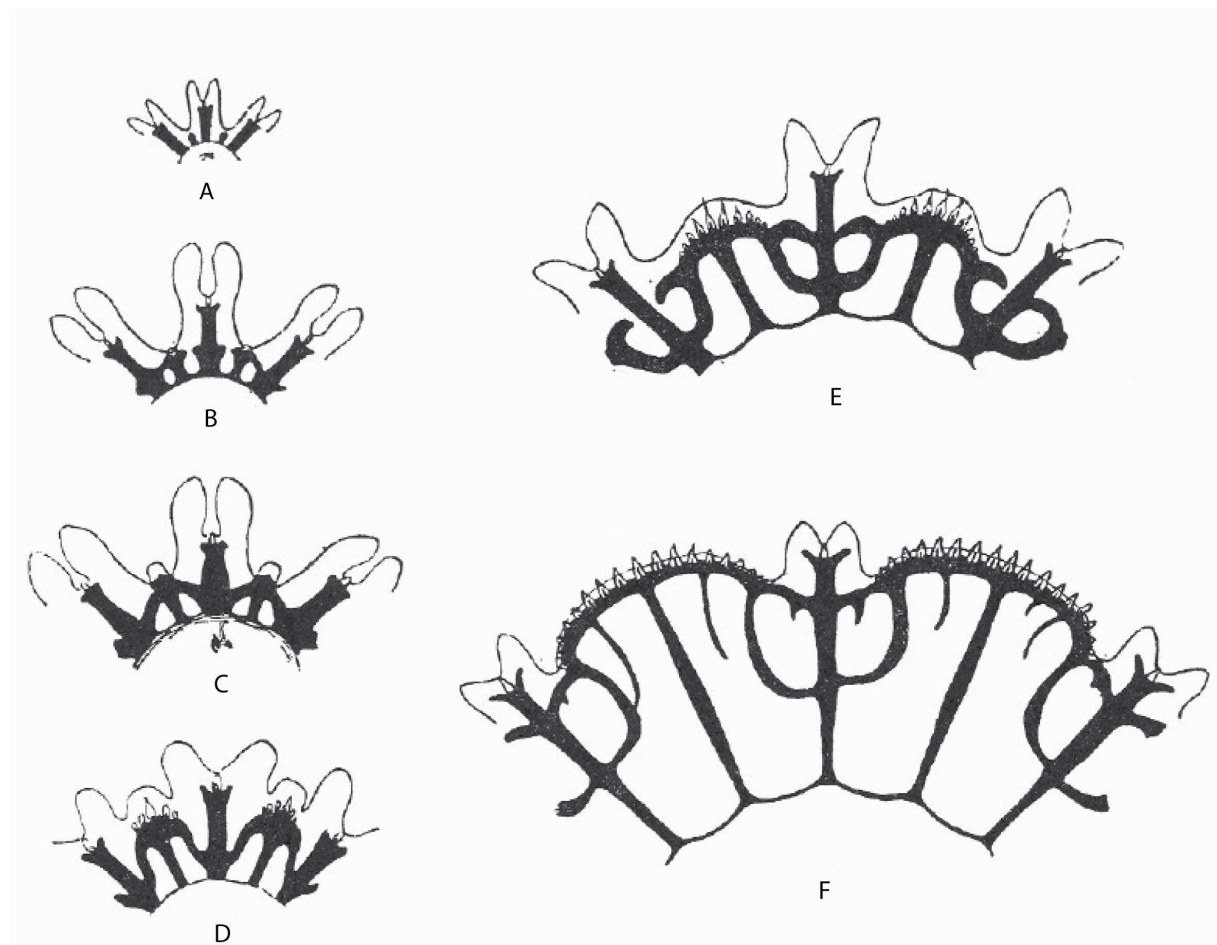
#### 1.4.2. Les étapes de la croissance des canaux

La croissance des canaux se déroule en plusieurs étapes : une première étape qui correspond au passage de l'éphyrule à la méduse et une seconde qui accompagne la croissance du diamètre de l'ombrelle de la méduse.

#### 1.4.2.1. De l'éphyrule à la méduse

La transformation de l'éphyrule en méduse s'accompagne de nombreuses transformations morphologiques et d'une croissance particulière des canaux, associée à ces transformations, et décrite par Russel [133]. L'éphyrule a une forme d'étoile à 8 branches, et la méduse une forme de disque. Lors du passage de l'éphyrule à la méduse, les tissus entre les 8 bras de l'éphyrule croissent plus rapidement que le reste, de sorte que l'étoile à 8 branches devient un disque.

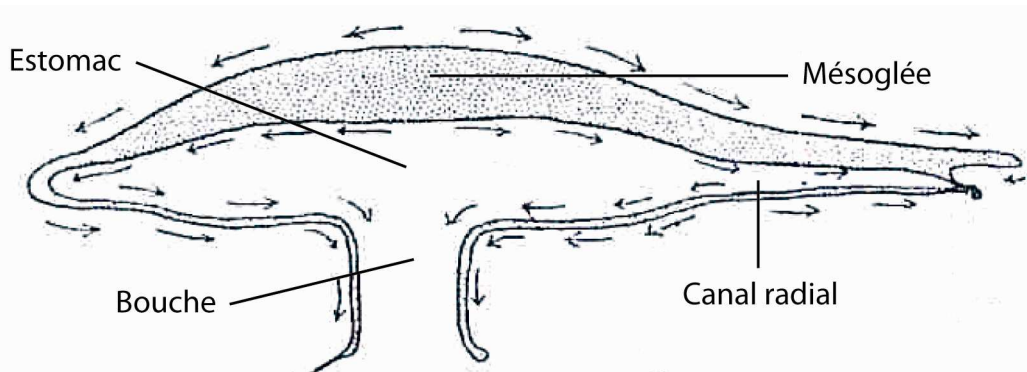
La figure suivante présente schématiquement les différentes étapes de la croissance des canaux de l'éphyrule à la méduse [133] (figure 1.27). Seul un quart de la méduse est représenté à chaque étape. Les canaux sont représentés par des traits noirs.



**Figure 1.27** – Schéma des étapes de la croissance des canaux d'*Aurelia aurita* (extrait de [133]).

Au stade éphyrule (stade A sur la figure 1.27), les canaux ne sont pas encore connectés entre eux. Un canal est présent dans chacun des 8 bras de l'éphyrule. De plus petits canaux sont également présents entre chacun des 8 bras. Ces canaux, n'étant pas connectés entre eux, sont des 'impasses' : l'eau et les fragments de nourriture qui circulent dedans font un 'aller-retour',

circulant depuis le centre de la méduse vers le bord sur la partie supérieure des canaux et dans le sens inverse sur la partie inférieure. La figure suivante (figure 1.28) présente la circulation de l'eau et de la nourriture dans les canaux de l'éphyrule [59]. Cette figure représente une coupe longitudinale d'éphyrule : à droite, la coupe passe à travers un bras, et à gauche, elle est située entre deux bras de l'éphyrule. Le sens de circulation de l'eau, à l'extérieur et à l'intérieur de l'animal, est représenté par des flèches. Cette circulation, que ce soit sur la peau de l'éphyrule ou dans ses canaux, est assurée par des cellules ciliées.



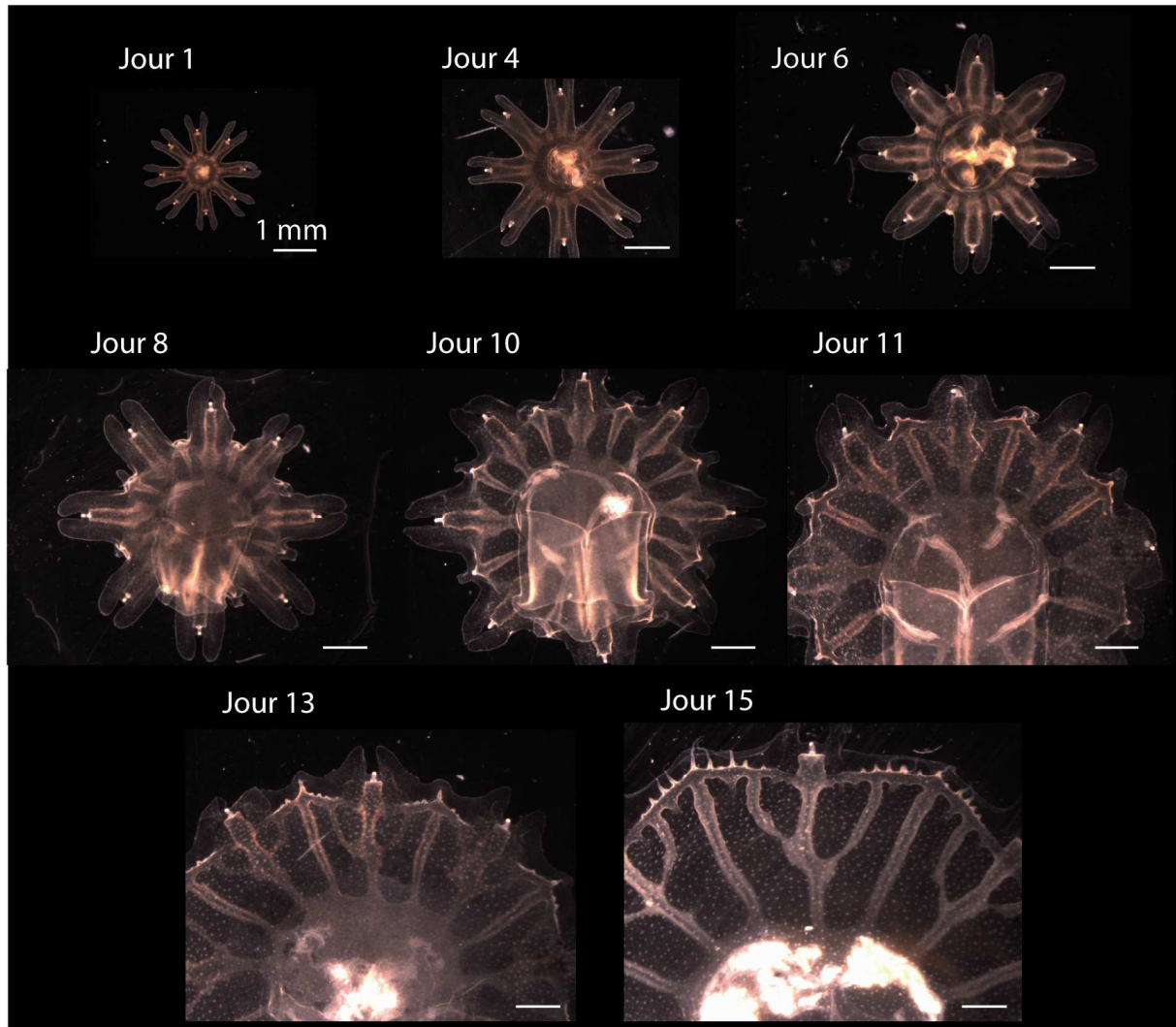
**Figure 1.28** – Schéma d'une coupe longitudinale d'une éphyrule sur lequel est représenté le sens de circulation de l'eau (extrait de [59]).

Lorsque l'éphyrule grandit, les différents canaux radiaux situés dans les bras et entre les bras se connectent entre eux : des canaux transverses apparaissent entre les bras des éphyrules (stades B et C sur la figure 1.27). Les tissus entre les bras de l'éphyrule croissant plus vite que le reste, les canaux transverses sont entraînés et déformés par la croissance des tissus (stade D sur la figure 1.27). Puis, de nouvelles connections transverses apparaissent, afin de former le canal circulaire (stade E sur la figure 1.27). Après ces différentes transformations, le motif des canaux est le suivant : un canal circulaire autour de l'ombrelle, et une alternance de canaux branchés en forme de trident et de canaux non branchés. À ce stade, les nouveaux canaux apparaissent à partir du canal circulaire, entre les canaux existants, et grandissent vers le centre de la méduse (stade F sur la figure 1.27).

Ces différents stades ont été visualisés chez une dizaine de méduses, au cours de leur développement. Les images ont été obtenues grâce à une loupe binoculaire, de 1 à 2 h après que les méduses aient ingéré des artemias. Les images suivantes représentent les grandes étapes de développement décrites précédemment, au cours du temps (figure 1.29).

On voit clairement l'apparition de la connexion transverse entre les canaux radiaux au cours des dix premiers jours. Puis, ces connections se déforment, et de nouvelles connections apparaissent pour former le canal circulaire (jours 11 et 13). Les canaux radiaux présentent alors le motif caractéristique d'une alternance entre canaux non branchés et canaux branchés en forme de trident dont chaque canal du milieu est connecté à un rhopalium (jour 15).



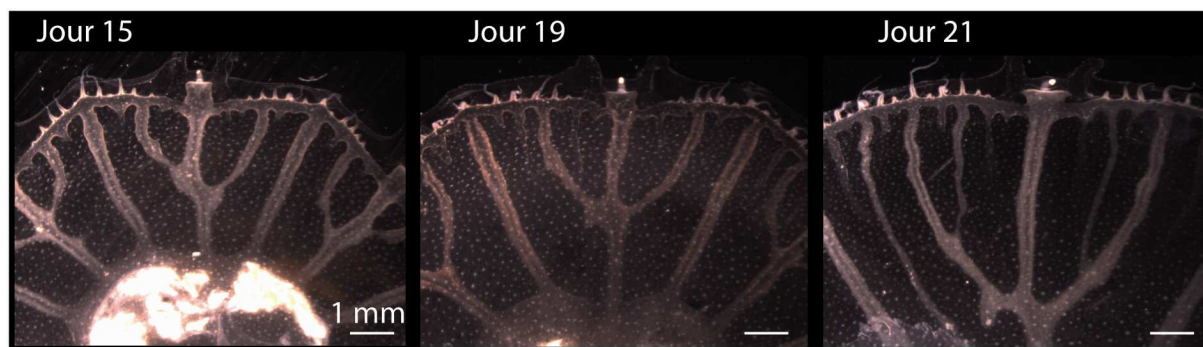


**Figure 1.29** – Visualisation au cours du temps des étapes de la croissance des canaux d'*Aurelia aurita*, du stade éphyrule au stade méduse.

#### **1.4.2.2. Croissance des canaux de la méduse**

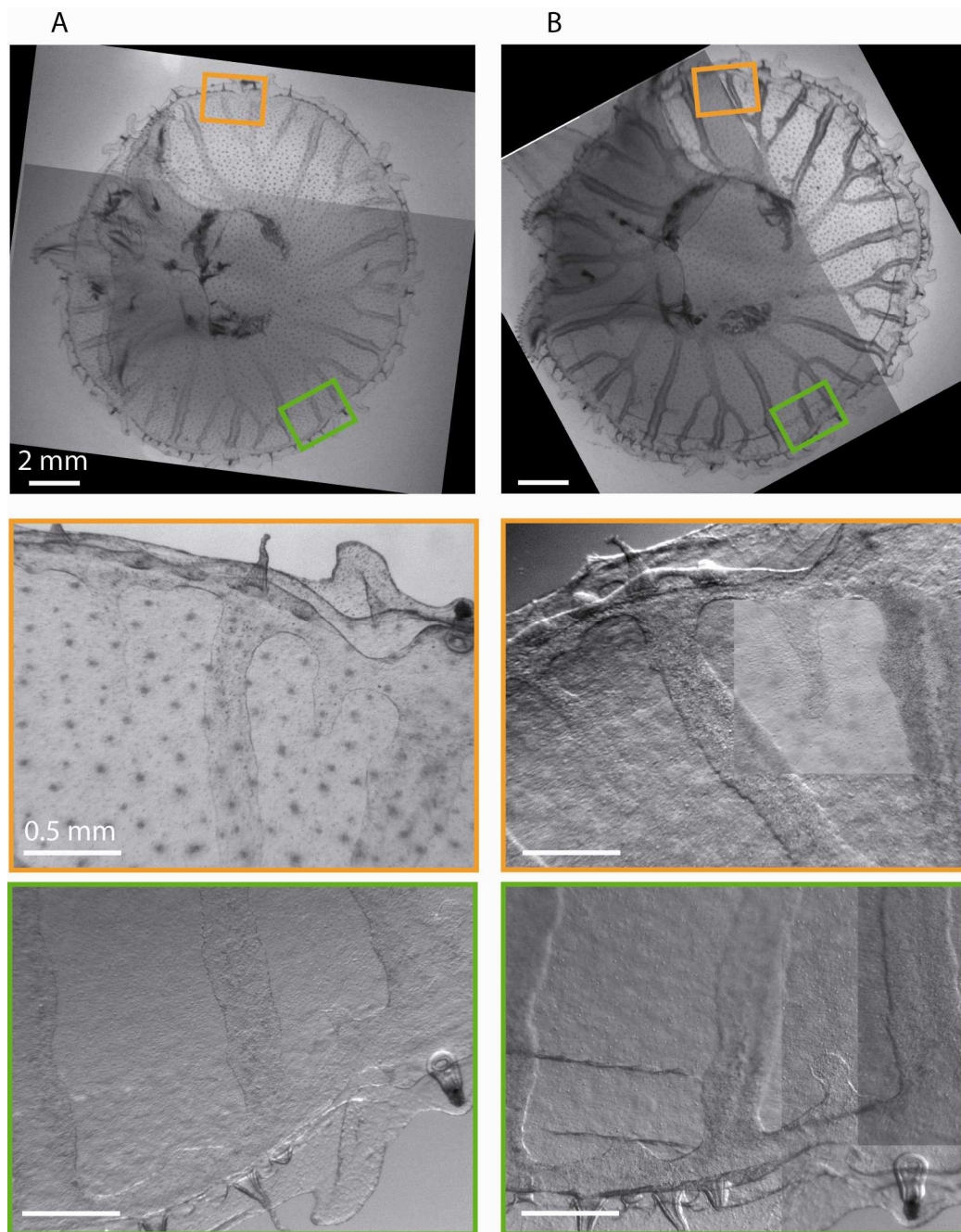
Une fois que l'éphyrule est devenue une petite méduse, la croissance de nouveaux canaux se fait à partir du canal circulaire : de nouveaux canaux apparaissent entre les canaux existants, depuis le canal circulaire, et grandissent vers le centre. Ils se connectent alors au réseau de canaux existant.

Les images suivantes, toujours prises grâce à une loupe binoculaire lors du suivi du développement d'une dizaine de méduses, montrent l'apparition et la croissance de ces nouveaux canaux, depuis le canal circulaire (figure 1.30).



**Figure 1.30** – Visualisation au cours du temps des étapes de la croissance des canaux d'*Aurelia aurita* au stade méduse.

Annemiek Cornelissen et Andrés Felipe Diaz Delgadillo, qui a effectué son stage de recherche de M2 dans notre équipe, ont suivi au cours du temps la croissance de plusieurs méduses, et l'apparition de leurs canaux. La figure suivante (figure 1.31) montre la même méduse, visualisée pendant deux jours consécutifs. La figure 1.31 A correspond au premier jour, et la figure 1.31 B au second. Dans les deux cas, sont observés à la loupe binoculaire l'ombrelle entière de la méduse, ainsi que des détails de deux régions du bord de l'ombrelle, où apparaissent des canaux. Ces régions sont indiquées par des cadres orange et vert. Ces images confirment le fait que les canaux bourgeonnent à partir du canal circulaire, entre les canaux existants, et grandissent vers le centre de la méduse. Il est intéressant de noter que la croissance des canaux est associée à une croissance globale de l'ombrelle de la méduse. Ainsi, sur la figure 1.31, nous pouvons observer qu'en un jour, le diamètre de la méduse est passé environ de 1.4 à 1.5 mm, le canal de la zone orange de 0.3 à 0.6 mm, et le canal de la zone verte de 0.1 à 0.2 mm. L'ombrelle a donc grandi d'environ 7%, et les canaux de 200%. Ainsi, le taux de croissance des canaux est notablement supérieur à celui des autres tissus : les canaux ne grandissent pas seulement grâce à une dilatation globale liée à la croissance des tissus de l'ombrelle, mais croissent également dans l'ombrelle, et ce plus rapidement que les autres tissus.

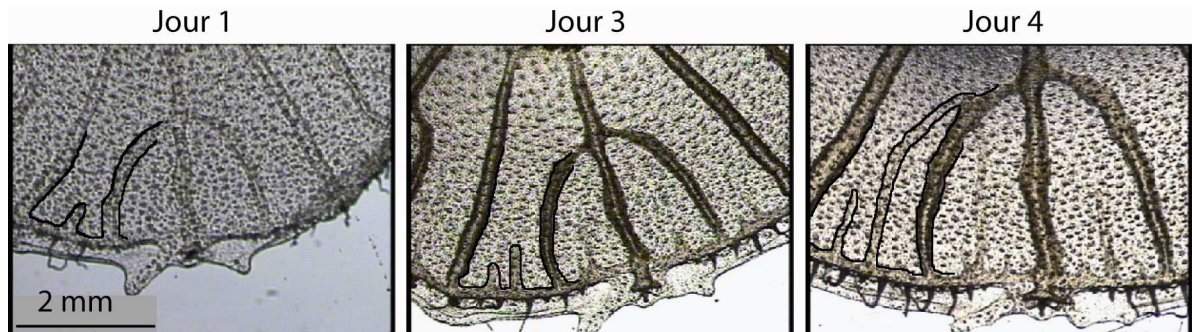


**Figure 1.31** – *Observation au cours du temps des étapes de la croissance globale de l'ombrelle d'une méduse, et de deux de ses canaux. À gauche (A) : visualisation le premier jour. À droite (B) : visualisation le jour suivant.*

Annemiek Cornelissen et Vincent Fleury ont observé la croissance de nombreuses méduses à la Cité de la Mer de Cherbourg, et ont montré que les nouveaux canaux grandissent dans une direction déterminée : ils grandissent vers les canaux branchés, et évitent les canaux non branchés. La figure suivante (figure 1.32) montre la croissance de nouveaux canaux chez la même méduse, suivie pendant 4 jours : comme précédemment, on observe que de nouveaux canaux apparaissent depuis le canal circulaire, entre les canaux existants, et grandissent vers

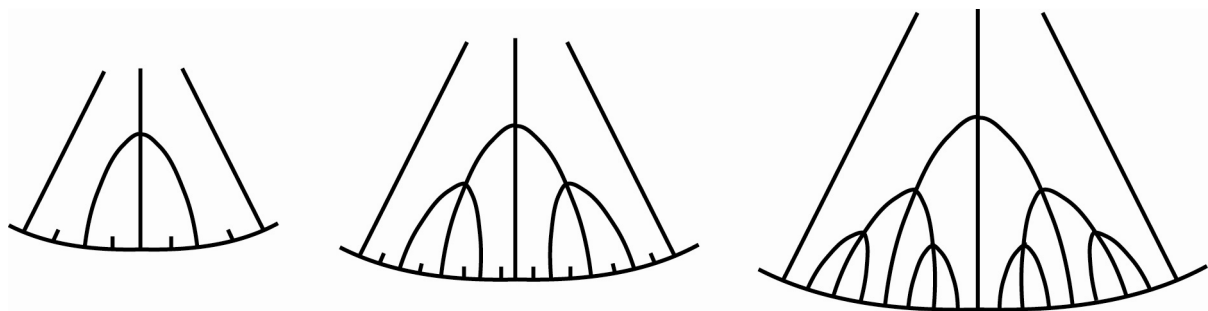


le centre de la méduse ; puis, ils se connectent aux canaux en forme de trident, et évitent le canal non branché situé à gauche. Pour plus de clarté, le contour des canaux que l'on suit ont été surlignés en noir.



**Figure 1.32** – Visualisation de la croissance d'un canal au cours du temps.

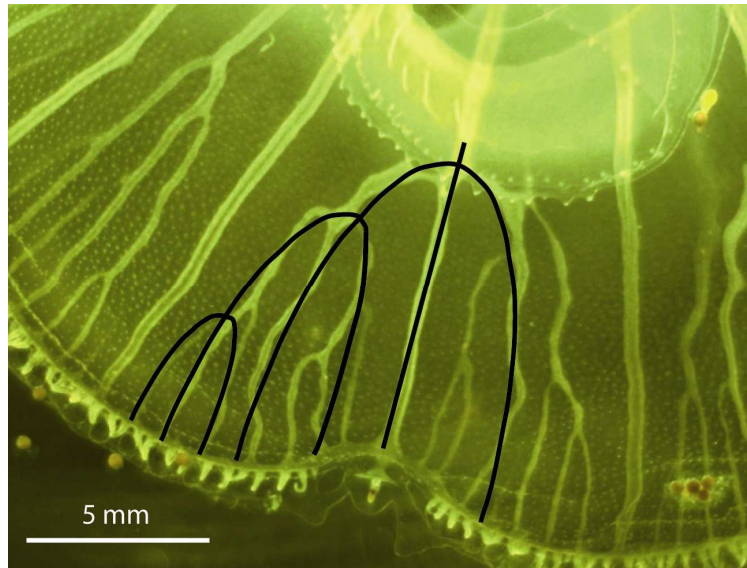
Par la suite, à chaque génération, le nouveau canal se connectera au canal de la dernière génération, comme représenté sur la figure suivante (figure 1.33).



**Figure 1.33** – Schéma de différentes étapes de la croissance des canaux.

Ainsi, un nouveau canal, qui croît entre deux canaux, dont l'un est jeune et l'autre vieux, se connectera au plus jeune. Il est intéressant de noter que ceci est vrai dès le stade de 'départ', lorsque canaux non branchés alternent avec canaux en forme de trident. En effet, le canal formant la branche centrale du trident est plus vieux que les canaux des deux autres branches, car les canaux des branches centrales des tridents sont issus des tous premiers canaux, présents dans les 8 bras des éphyrules (stade A sur la figure 1.27). Les canaux non branchés sont également plus vieux que les canaux des deux branches périphériques des tridents, car ils sont issus des tous premiers canaux présents entre les bras des éphyrules (stade A sur la figure 1.27).

Le fait que chaque nouveau canal se connecte au canal déjà formé le plus jeune conduit à une organisation fractale du réseau gastrovasculaire [78]: un même motif de trident se répète aux différentes échelles (figure 1.34, réalisée par Vincent Fleury).



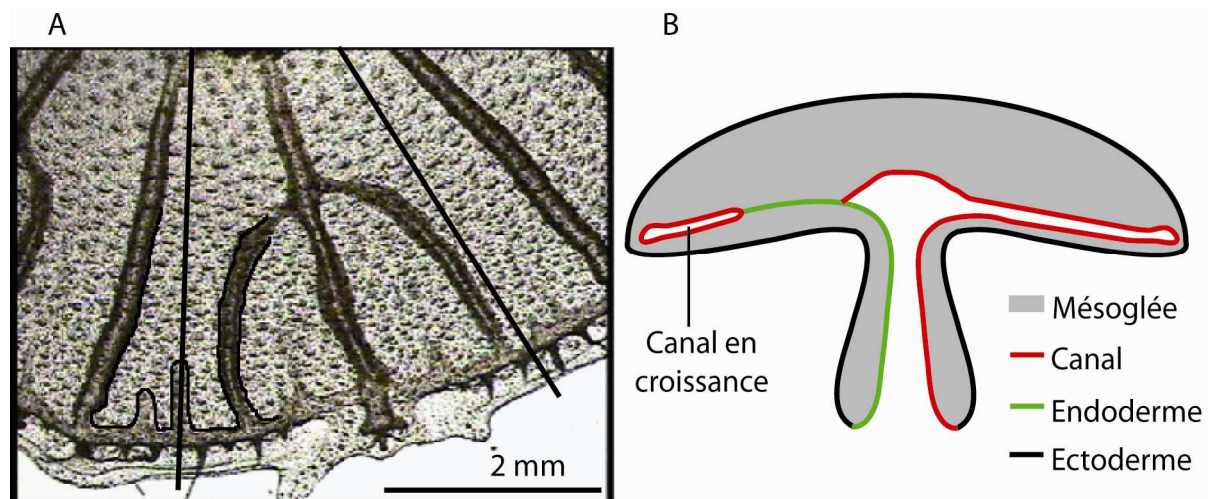
**Figure 1.34** – *Visualisation de l'organisation fractale des canaux.*

Nous devons toutefois noter que, comme il arrive souvent dans le vivant, la règle de croissance énoncée précédemment peut présenter des variantes [29,78]: les canaux peuvent parfois bourgeonner à partir d'un canal radial, puis se connecter à un autre canal radial, ou au canal circulaire, et il peut arriver qu'un canal en croissance se connecte à vieux canal et non à un jeune.

#### ***1.4.2.3. Croissance des canaux dans l'endoderme***

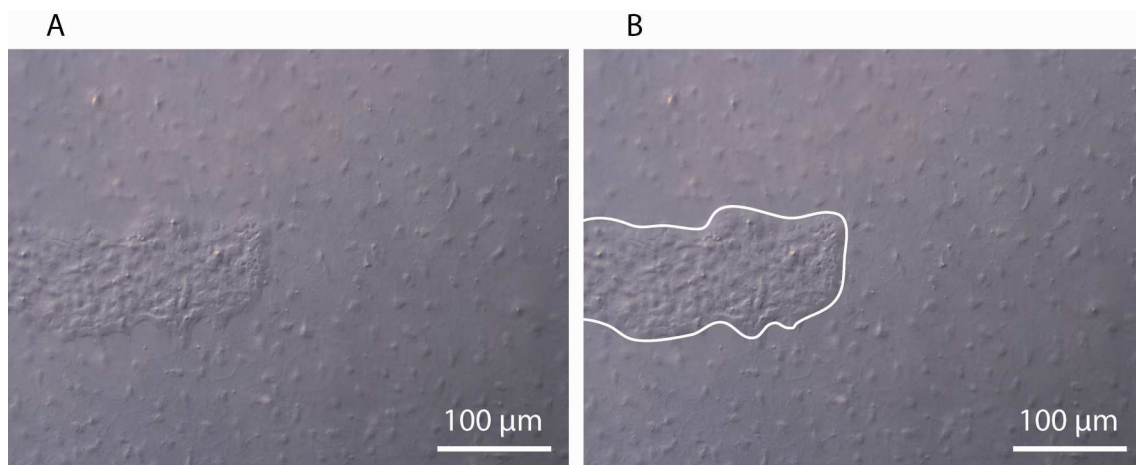
Précisons à présent l'anatomie d'un canal en croissance : comme nous l'avons vu dans le paragraphe 1.4.1.2., les canaux sont reliés entre eux par un mince feuillet de cellules : l'endoderme.

Un nouveau canal croît dans l'endoderme. La figure 1.35 B présente une vue schématique d'une coupe longitudinale à travers un canal en croissance (à gauche) et à travers un canal non branché (à droite). Les zones de la méduse correspondant à ces coupes sont indiquées par des traits noirs sur la figure 1.35 A.



**Figure 1.35** – Schéma d'une coupe longitudinale d'une méduse. À gauche (A) : les deux plans de coupe. À droite (B) : coupe longitudinale de la méduse.

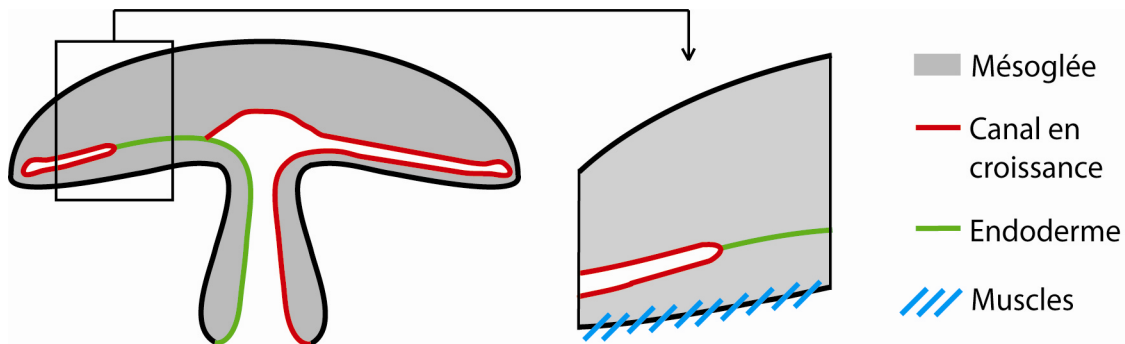
La figure suivante (figure 1.36) présente une vue de dessus d'un canal en croissance, observé au microscope, à l'objectif 20X, en contraste interférentiel différentiel (le principe de cette technique est détaillé en annexe A). Sur la partie droite de la figure (figure 1.36 B), les contours du canal en croissance ont été surlignés, pour plus de clarté. Le canal en croissance est entouré par de nombreuses cellules (les bosses correspondent aux noyaux de ces cellules), qui constituent les cellules de l'endoderme.



**Figure 1.36** – Visualisation d'un canal en croissance, entouré de l'endoderme. Sur l'image de droite (B), les contours du canal sont surlignés.

La structure détaillée de l'endoderme, de la jonction canal/endoderme, et les processus de croissance d'un canal dans l'endoderme seront détaillés dans le troisième chapitre de ce travail.

Comme nous l'avons vu en introduction, la morphogenèse dans le vivant est un processus complexe qui implique des contrôles génétiques, chimiques, et mécaniques. Dans le cadre de cette thèse, nous avons étudié les facteurs physiques pouvant jouer un rôle dans la morphogenèse du système gastrovasculaire de la méduse *Aurelia aurita*. Nous nous sommes intéressé aux propriétés mécaniques des différents tissus entourant un canal en croissance, et avons cherché à comprendre leur rôle dans la direction de croissance d'un nouveau canal. Ces différents tissus sont la mésoglée, l'endoderme et les muscles (figure 1.37).



**Figure 1.37** – Schéma des tissus entourant un canal en croissance.

Dans le chapitre suivant, nous exposerons notre étude de la mésoglée et de ses propriétés mécaniques. Puis, nous présenterons dans les chapitres suivants notre travail sur l'endoderme, et son comportement mécanique en réponse aux contractions musculaires de la méduse.

## 2. La mésoglée

### 2.1. Introduction

La mésoglée est située entre les feuillets cellulaires épidermiques et endodermiques. En volume, elle correspond au tissu principal de la méduse. Elle est essentiellement constituée de matrice extracellulaire [9]. Chez *Aurelia aurita*, elle contient également des cellules mobiles, isolées, et distribuées de manière éparse entre les fibres, les cellules mésogléennes [143].

#### 2.1.1. La matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire désigne l'ensemble des matériaux extracellulaires présents dans les tissus. Elle se trouve notamment dans les tissus conjonctifs, dont on peut donner comme exemple chez l'homme les tendons, la cornée, le derme, les tissus adipeux, les cartilages, les os... La matrice extracellulaire est composée de fibres et de macromolécules.

Parce que ses constituants ont de nombreux domaines de liaison avec les cellules, la matrice extracellulaire joue un rôle crucial pour le soutien structural, l'adhérence, la migration, la régulation et la communication cellulaire [15,70,157]. Ainsi, les intégrines (protéines présentes sur la membrane cellulaire), peuvent se fixer aux protéines du milieu extracellulaire, ce qui conduit à l'activation de nombreuses cascades de signalisation dans la cellule, conduisant à sa différenciation, sa prolifération, sa migration... [30,58,69,162]. Les interactions entre cellules et matrice ne sont pas seulement biochimiques, mais également mécaniques : les propriétés viscoélastiques de la matrice extracellulaire jouent un rôle majeur dans les comportements cellulaires, l'organisation des tissus, la morphogenèse et le développement [47,54,75].

#### 2.1.2. Composition et rôle de la mésoglée

La mésoglée est constituée de cellules mésogléennes et de matrice extracellulaire. Cette dernière est un gel fibreux extrêmement hydraté contenant entre autres des fibres de collagène [20,26,27,133,144], des microfibrilles riches en protéines analogues à la fibrilline [128] et des macromolécules telles que les mucopolysaccharides [20]. Les fibres de collagène donnent à la mésoglée sa rigidité, et les microfibrilles de fibrilline son élasticité [106]. Les cellules mésogléennes participent à la production des fibres de la mésoglée [143].

Comme pour les vertébrés, la matrice extracellulaire de la méduse est un support cellulaire [20], permettant le soutien structural du corps de l'animal, et joue un rôle essentiel dans le contrôle de la migration cellulaire, la différenciation et la morphogenèse



[56,82,136,139,145,149]. Elle permet également le transport des nutriments [20] et la régulation de la flottabilité de la méduse [42]. Par ailleurs, elle est essentielle à la nage de la méduse. La méduse n'a en effet pas de muscles antagonistes, et après une contraction musculaire, la méduse retrouve sa forme initiale grâce à l'élasticité de la mésoglée : certaines des fibres qui la constituent se comportent comme des ressorts qui se compriment sous l'effet de la contraction musculaire et qui se détendent et retrouvent élastiquement leur forme initiale dès que les muscles se relâchent [26,60,106].

### **2.1.3. Présentation de notre étude de la mésoglée**

Le rôle des propriétés mécaniques de la matrice extracellulaire étant essentiel dans la morphogenèse, et la mésoglée étant le principal tissu qui entoure les canaux en croissance, nous avons cherché à comprendre le rôle de sa structure et de ses propriétés viscoélastiques dans la morphogenèse du système gastrovasculaire. Nous avons vu en effet dans le chapitre précédent que les canaux avaient une direction de croissance déterminée : ils croissent vers, puis se connectent aux canaux les plus jeunes. Nous nous sommes demandé si la matrice extracellulaire n'était pas plus rigide autour des canaux les plus vieux, ce qui aurait conduit les canaux en croissance à éviter ces vieux canaux, et à se connecter aux plus jeunes. Nous avons également cherché à savoir si une éventuelle organisation particulière des fibres de la matrice aurait pu guider la croissance d'un nouveau canal dans une certaine direction.

Nous avons par conséquent cherché à mesurer les propriétés mécaniques de la matrice extracellulaire, et à visualiser son organisation. Lors de notre étude, nous avons été amenées à mesurer les propriétés physiques et à observer l'organisation fibreuse de la mésoglée de méduses à différents stades de développement. Nous avons constaté une évolution des propriétés mécaniques et structurelles de la mésoglée, entre les méduses juvéniles et les méduses adultes. Une méduse juvénile est une méduse qui vient de quitter le stade éphyrule pour atteindre le stade méduse ; son ombrelle est donc ronde, elle a un diamètre de l'ordre de 1 cm, et son âge est entre 3 semaines et 1 mois. Une méduse adulte est une méduse capable de se reproduire ; elle a un diamètre de l'ordre de 10 cm, et son âge est d'environ 6 mois.

Si nos études ne semblent pas avoir mis en évidence une contribution simple et directe des propriétés mécaniques de la mésoglée à la direction de croissance des canaux, il nous a paru intéressant d'approfondir cette question du vieillissement de la mésoglée. Nous avons pu la décrire, l'interpréter et la mettre en rapport avec les contraintes mécaniques subies par la mésoglée lors des contractions musculaires de la méduse. Cette étude a été publiée dans *Biophysical Journal* [57]. L'article est reproduit en annexe B.

Par ailleurs, comme nous le verrons par la suite (chapitre 4), l'étude des propriétés mécaniques de la mésoglée s'est avérée particulièrement importante pour la compréhension de la structure mécanique des tissus entourant les canaux, afin de pouvoir élaborer un modèle de croissance.

Nous présenterons en premier lieu nos expériences de visualisation de la structure et de l'organisation de la mésoglée. Puis, nous exposerons nos mesures de ses propriétés mécaniques, aux échelles macroscopiques et microscopiques. Enfin, nous interpréterons et discuterons les résultats obtenus.

## **2.2. Structure de la mésoglée**

La mésoglée est quasiment transparente, et c'est pourquoi sa structure est difficilement observable.

Les fibres de la mésoglée de différentes espèces de méduses ont pu être observées par des techniques variées : Chapman a pu visualiser les fibres principales de la mésoglée d'*Aequorea vitrina*, *Aurelia aurita*, *Cyanea Lamarcke*, *Chrysaora mediterranea*, et *Calliactis parasitica*, après fixation, coupe et marquage histologique [27] et de *Pelagia noctiluca* après découpe de tranches fraîches de méduse et observation au microscope à contraste de phase [26]; Weber et Schmid ont pu observer les fibres larges et fines de *Polyorchis penicillatus* et *Aglantha digitale* par des méthodes histochimiques et par microscopie électronique à balayage [160].

Nous avons pour notre part pu observer les fibres principales de la mésoglée d'*Aurelia aurita* par microscopie à contraste interférentiel différentiel, et les petites fibres fines par microscopie électronique à balayage.

### **2.2.1. Observation par microscopie à contraste interférentiel différentiel des fibres larges**

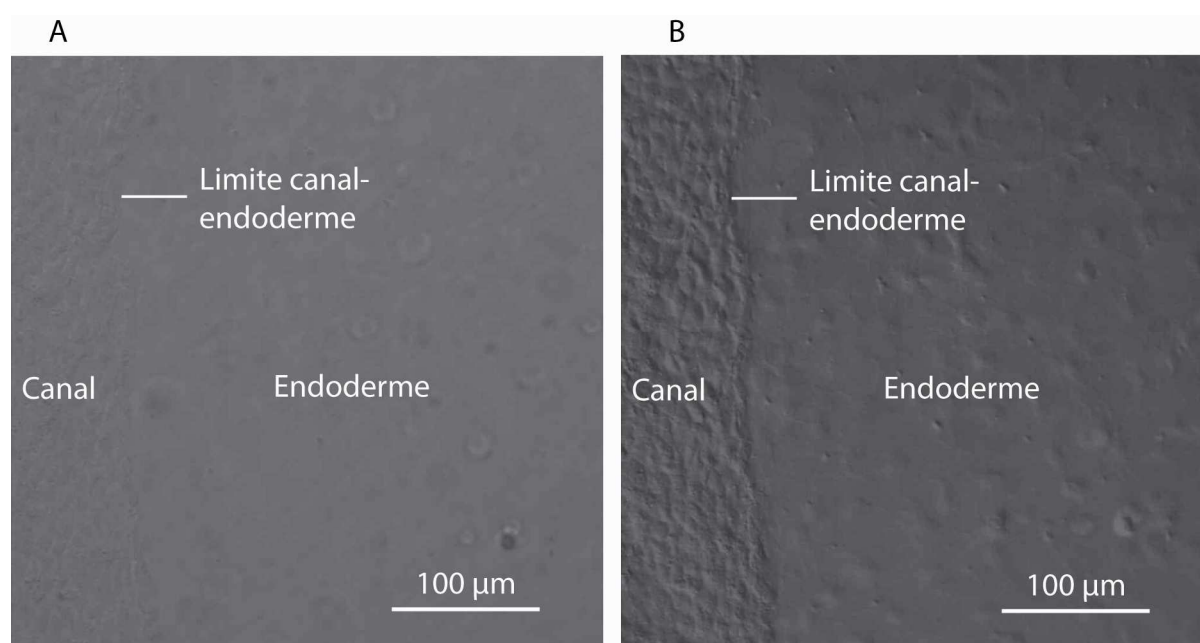
Nous présenterons tout d'abord le principe de la microscopie à contraste interférentiel différentiel, puis le protocole suivi, et les observations des fibres principales de la mésoglée.

#### ***2.2.1.1. La microscopie à contraste interférentiel différentiel***

La microscopie à contraste interférentiel différentiel est une technique optique qui permet d'augmenter le contraste d'échantillons transparents. Cette technique est basée sur l'interférométrie, qui permet de voir les légères variations de chemin optique à travers un échantillon et ainsi de visualiser des détails qui passeraient sinon inaperçus. Cette technique est présentée en annexe A.

La microscopie à contraste interférentiel différentiel est adaptée à des échantillons transparents et relativement homogènes, présentant de faibles variations d'indice. Elle est particulièrement adaptée à la visualisation de cellules *in vitro*, et n'est normalement pas

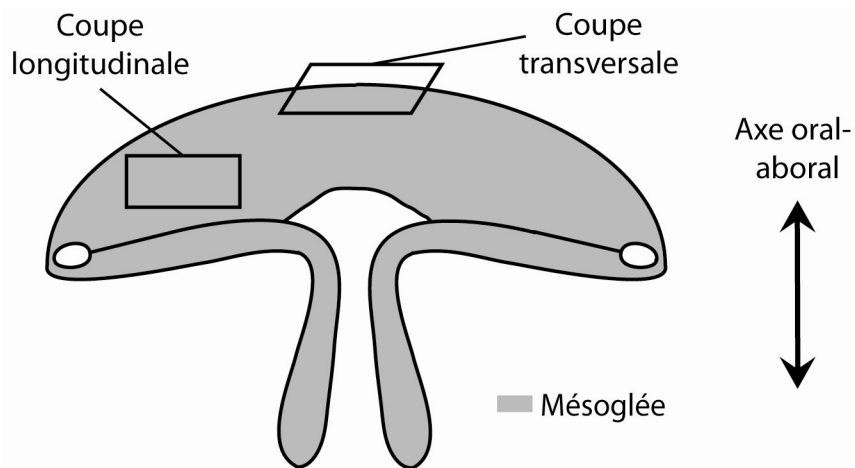
recommandée pour l'observation de tissus épais, présentant d'importantes variations de propriétés optiques. Cependant, la méduse présentant de minces couches cellulaires et une épaisse couche de mésogée, transparente et assez homogène, la microscopie à contraste interférentiel différentiel s'est avérée très adaptée à la visualisation de cet animal, *in vivo*. La figure 2.1 présente une visualisation d'un canal et de l'endoderme, avec et sans contraste interférentiel différentiel. Il apparaît que les différentes structures, quasiment invisibles en microscopie standard, deviennent apparentes en microscopie à contraste interférentiel différentiel.



**Figure 2.1** – Visualisation d'un canal et de l'endoderme. À gauche (A) : visualisation en microscopie, sans le contraste interférentiel différentiel. À droite (B) : visualisation de la même zone en microscopie, avec le contraste interférentiel différentiel.

#### 2.2.1.2. Protocole

La microscopie à contraste interférentiel différentiel nous a permis de visualiser les fibres larges présentes dans la mésogée des méduses adultes.



**Figure 2.2** – Schéma d'une méduse et des plans de coupes longitudinale et transversale réalisés pour l'observation des différentes fibres de la mésoglée.

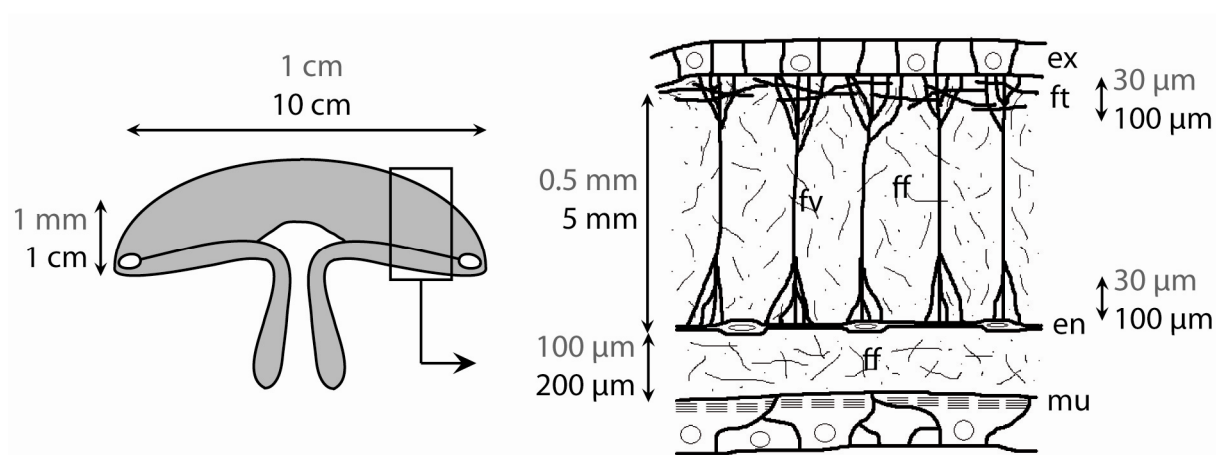
Nous avons découpé *in vivo* des tranches de mésoglée chez des méduses adultes (qui ont un diamètre de l'ordre de 10 cm, et sont âgées de 6 mois environ). Ces tranches avaient une longueur typique de quelques centimètres, et une épaisseur de l'ordre de quelques millimètres. Elles ont été coupées le long de l'axe oral-aboral (coupe longitudinale), ou perpendiculairement à cet axe (coupe transversale) (figure 2.2). Elles ont été observées par microscopie à contraste interférentiel différentiel (microscope Leica DMI 3000 B et objectif Leica PL Fluotar 20X/0.40 Corr). Les images ont été acquises par une caméra (caméra Scion CFW-1612M), contrôlée par le logiciel ImageJ. Les tranches devaient être observées relativement rapidement et ne pas rester trop longtemps sous le microscope (pas plus de 15 min) afin de ne pas sécher.

### 2.2.1.3. Observations

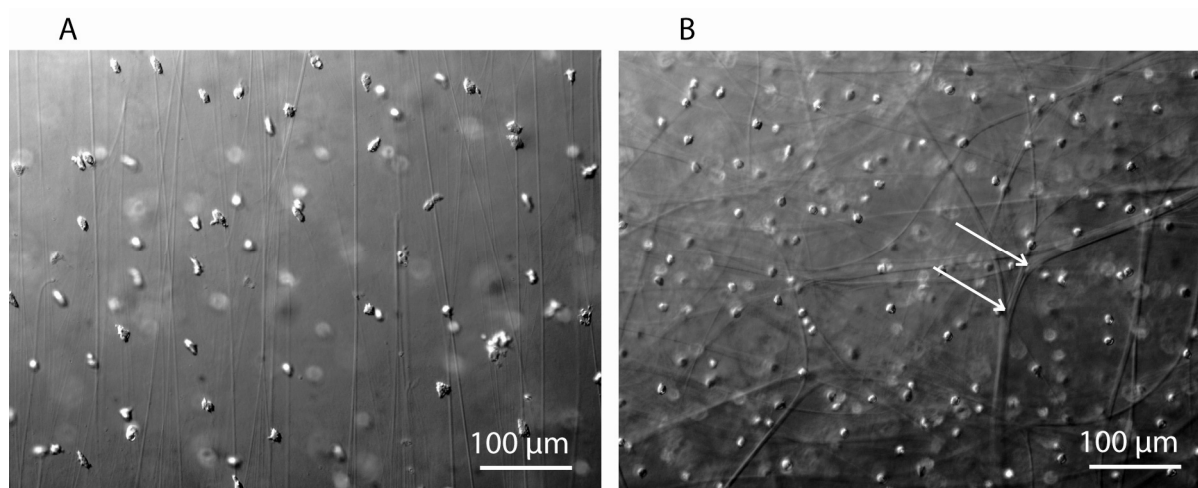
Les tranches de méduse, observées en contraste interférentiel différentiel, ont permis d'observer les fibres larges présentes dans la mésoglée. Nous avons observé que, comme cela a été décrit dans d'autres espèces de méduses, la mésoglée est traversée par des fibres larges qui ont une organisation particulière [27,60,106,160]. Weber et Schmid ont décrit en détail le réseau fibreux de la matrice extracellulaire de la méduse *Polyorchis penicillatus*, [160] et Chapman celui de *Pelagia Noctiluca* [26]. Nous avons trouvé la même architecture chez *Aurelia aurita* (figure 2.3): des fibres larges traversent la mésoglée verticalement parallèlement à l'axe oral-aboral, entre la peau de l'ex-ombrelle, et l'endoderme. Au voisinage de l'ex-ombrelle, les fibres larges verticales se divisent, deviennent branchées, et pénètrent dans un enchevêtrement de fibres déployées tangentiellement, dans toutes les directions. Aucune orientation des fibres larges n'a pu être observée entre la sous-ombrelle et

l'endoderme. Chez les méduses juvéniles (qui ont un diamètre de l'ordre de 1 cm, et sont âgées de 1 mois environ), la résolution de la microscopie à contraste interférentiel différentiel était insuffisante pour observer correctement l'architecture des fibres larges, qui étaient plus fines que chez les méduses adultes ; cependant, nous avons pu occasionnellement observer *in vivo* quelques fibres verticales traversant la mésoglée des méduses juvéniles.

Les fibres sont ancrées aux couches cellulaires (l'ectoderme de l'ex-ombrelle et l'endoderme) [160]. Nous avons observé de nombreuses cellules mésogléennes, distribuées aléatoirement, et qui sont visibles sur la figure 2.4. Le diamètre des fibres larges est variable, et peut atteindre 12  $\mu\text{m}$ . Nous avons pu observer que les fibres larges semblent être elles-mêmes constituées de fibres un peu plus fines : les fibres larges peuvent se diviser, comme nous pouvons le voir sur la figure 2.4. Elles sont entourées par un dense réseau tridimensionnel de fibres fines qui emplit le volume de la mésoglée. Cette structure de fibres fines est transparente à la lumière, mais peut être observée par microscopie électronique à balayage.



**Figure 2.3** – Schéma de l'organisation des fibres de la mésoglée d'*Aurelia aurita*. Pour des raisons de clarté, le dessin des fibres ne respecte pas les dimensions véritables. Les longueurs caractéristiques de l'organisation fibreuse sont indiquées en noir pour les méduses adultes et en gris pour les méduses juvéniles. Endoderme (en) ; ex-ombrelle (ex) ; fibres fines (ff) ; fibres larges tangentiels (ft) ; fibres larges verticales (fv) ; muscles de la sous-ombrelle (mu). Figure adaptée de [160].



**Figure 2.4** – Visualisation de l’organisation des fibres larges de la mésoglée d’*Aurelia aurita* en microscopie à contraste interférentiel différentiel. À gauche (A) : visualisation des fibres verticales. À droite (B) : visualisation des fibres tangentielles. Les deux flèches indiquent des points de division des fibres.

### 2.2.2. Observation par microscopie électronique à balayage des fibres fines

Nous présenterons tout d’abord le protocole suivi, puis les observations des fibres fines de la mésoglée en microscopie électronique à balayage (MEB). Notons que le principe de cette technique est détaillé en annexe A.

#### 2.2.2.1. Protocole

La microscopie électronique à balayage nous a permis de visualiser les fibres fines présentes dans la mésoglée des méduses. La préparation des échantillons et leur visualisation ont été réalisées sur la plateforme de microscopie électronique à balayage du bâtiment de chimie de l’Université Paris VII, avec David Montero. Spécialiste de la préparation et de la visualisation d’échantillons biologiques en MEB, il nous a beaucoup aidés à élaborer un protocole permettant de préparer au mieux les méduses pour l’observation en MEB. Nous détaillons ici ce protocole.

Avec l’aide de Nathalie Luciani, nous avons fixé des méduses juvéniles entières, ainsi que des morceaux de mésoglée de méduses adultes, prélevés dans la région centrale, traversée par les fibres verticales. La solution de fixatif était une solution de glutaraldéhyde à 5%, dans une solution de cacodylate à 0.1 mol/L [24]. Un 1 mL d’une telle solution était obtenu en mélangeant 200  $\mu$ L de glutaraldéhyde à 25 % (solution achetée chez Sigma, référence C4945) à 800  $\mu$ L de cacodylate à 0.125 mol/L. La masse molaire du cacodylate étant de 214 g/mol, 40 mL de cette dernière solution étaient obtenus en dissolvant 1.07 g de cacodylate en poudre

dans 40 mL d'eau distillée. L'osmolarité de cette solution, mesurée par un osmomètre, était voisine de 1050 mOsm, donc avait une osmolarité voisine de celle de l'eau de mer artificielle de nos aquariums, qui se situe entre 1000 et 1100 mOsm. Éviter un choc d'osmolarité permet en effet de préserver au mieux les tissus biologiques [95]. Afin que la fixation puisse être efficace, les échantillons sont immergés dans le fixatif pendant 1 h à température ambiante, puis toute la nuit à 4°C. Les échantillons sont ensuite rincés. La solution de rinçage est une solution de cacodylate à 0.5 mol/L. 40 mL de cette solution peuvent être obtenus en dissolvant 4.28 g de cacodylate en poudre dans 40 mL d'eau distillée. Cette solution a également une osmolarité voisine de 1050 mOsm. Les échantillons sont rincés une première fois pendant 1 h à 4°C, puis une seconde fois toute la nuit à 4°C. Ils sont ensuite déshydratés et séchés.

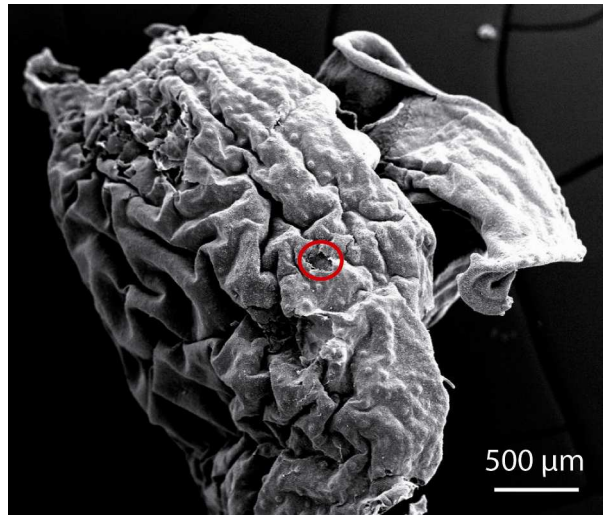
Pour cela, il convient tout d'abord de remplacer la solution de rinçage dans laquelle baignent les échantillons par de l'acétone. Les échantillons sont immergés dans des bains successifs de 10 min chacun, dans lesquels la concentration de la solution de rinçage diminue tandis que celle d'acétone augmente. Une fois que les échantillons sont dans des bains d'acétone pure, ils sont séchés par la méthode de contournement du point critique : l'acétone est remplacée par des bains successifs de concentration croissante de CO<sub>2</sub> liquide dans de l'acétone. La miscibilité de l'acétone et du CO<sub>2</sub> liquide rend ce remplacement possible. Une fois que les échantillons sont dans du CO<sub>2</sub> liquide pur, une transition de phase par contournement du point critique, c'est-à-dire en passant par l'état supercritique, permet de faire passer progressivement le CO<sub>2</sub> en phase vapeur. Ce contournement évite une transition de phase brutale de liquide à gaz, qui abîmerait les échantillons. Les échantillons sont alors parfaitement déshydratés : tout le liquide a été remplacé par de l'air. Ne restent que les architectures cellulaires et fibreuses.

Afin d'observer la structure fibreuse de la mésoglée, nous avons soulevé délicatement la peau des méduses juvéniles déshydratées. Cette opération a été réalisée à l'aide d'une fine aiguille et sous une loupe binoculaire, en différents endroits de l'ombrelle. Cela nous a permis d'observer le fin maillage fibreux, situé environ entre 100 et 400 µm au-dessus de l'endoderme. Les échantillons ont ensuite été métallisés par du platine. Les observations ont été réalisées avec un microscope électronique à balayage à émission par effet de champ (microscope MEB Zeiss Supra 40).

#### **2.2.2.2. Observations**

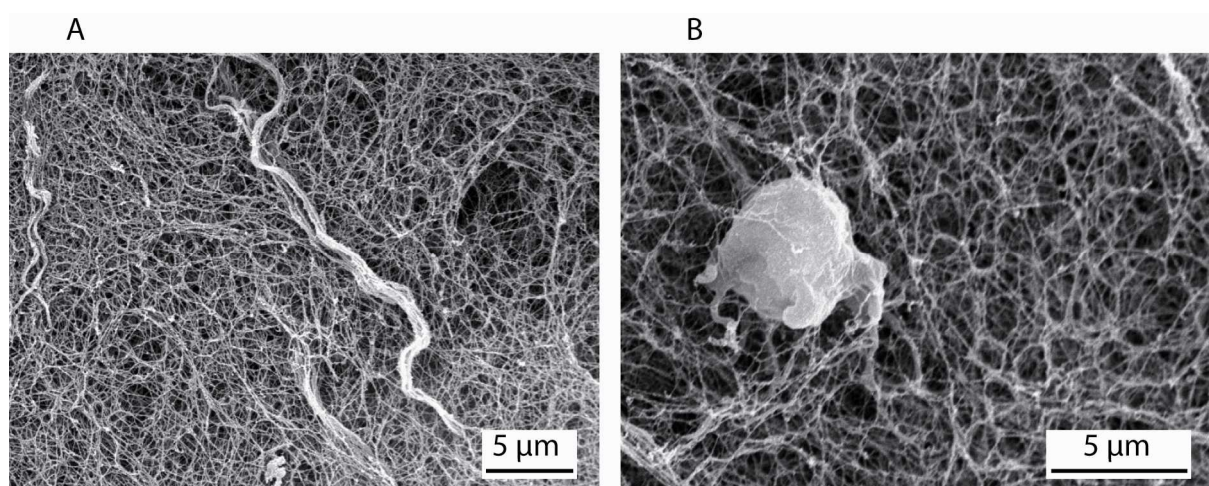
En raison de la grande quantité d'eau présente dans leur mésoglée, les méduses subissent une diminution de volume importante, quasiment d'un facteur deux, lors des différentes étapes de fixation, déshydratation à l'acétone, et particulièrement lors du séchage par contournement du point critique. Cette diminution de volume a été associée à un plissement de leur peau (figure 2.5). Ainsi, les dimensions du maillage fibreux et les diamètres des fibres observés en MEB sont sans doute inférieurs aux dimensions *in vivo* [119,126]. Cependant, malgré cette diminution de volume de la mésoglée, les observations faites avec la MEB donnent des informations intéressantes sur l'architecture et l'organisation du réseau fibreux [160].





**Figure 2.5** – Visualisation d’une méduse *Aurelia aurita* entière en microscopie électronique à balayage. Dans la zone marquée par le cercle rouge, la peau a été soulevée afin de pouvoir visualiser l’organisation des fibres.

La figure 2.6 montre la structure fibreuse de la mésoglée d’une méduse juvénile, observée en MEB, dans la zone de la mésoglée traversée par les fibres larges verticales. Nous pouvons observer des fibres larges, qui émergent d’un entremêlement de fibres fines. Ces fibres larges semblent formées par des agglomérations des fibres fines environnantes. Ce phénomène fut aussi observé par Weber et Schmid dans la méduse *Polyorchis penicillatus* [160]. La figure 2.6 B montre une cellule mésogléenne entourée du réseau de fibres fines. Nous pouvons observer que ces dernières sont distribuées aléatoirement, et de façon hétérogène et isotrope. Par ailleurs, la taille du maillage du réseau fibreux semble très variable. Une organisation similaire a pu être observée dans des morceaux de mésoglée provenant de méduses adultes.



**Figure 2.6** – Visualisation de l’organisation des fibres fines de la mésoglée d’*Aurelia aurita* en microscopie électronique à balayage. À gauche (A) : visualisation de fibres larges qui émergent d’un entremêlement de fibres fines. À droite (B) : visualisation d’une cellule mésogléenne entourée de fibres fines.



La visualisation des fibres de la mésoglée d'*Aurelia aurita* nous a ainsi permis de montrer que sa structure est formée de fibres larges organisées en fibres transversales et verticales, entourées d'un réseau de fibres fines distribuées de façon hétérogène et isotrope.

Nous exposerons dans les parties suivantes nos mesures des propriétés mécaniques de la mésoglée, tout d'abord à l'échelle macroscopique, puis localement, à l'échelle microscopique.

## **2.3. Propriétés mécaniques macroscopiques de la mésoglée**

Afin d'avoir un premier aperçu des propriétés mécaniques de la mésoglée, nous les avons mesurées globalement, à l'échelle macroscopique. La mésoglée est un matériau complexe, et, comme de nombreux tissus vivants, peut être décrit mécaniquement comme un matériau viscoélastique [4]. Afin d'avoir une première mesure de l'ordre de grandeur de l'élasticité et de la viscosité de ce tissu, nous avons réalisé des expériences de macrorhéologie, au moyen d'un rhéomètre.

Nous rappellerons tout d'abord quelques éléments de rhéologie ainsi que le principe du rhéomètre, puis nous présenterons le protocole et les expériences réalisées, et enfin les résultats obtenus.

### **2.3.1. La rhéologie, le rhéomètre**

#### **2.3.1.1. Quelques rappels de rhéologie**

Le principe des expériences de rhéologie est d'appliquer une contrainte connue à un matériau, et de mesurer la déformation correspondante, ou *vice versa*. La relation entre contrainte et déformation nous renseigne sur les propriétés mécaniques intrinsèques du matériau, comme son élasticité ou sa viscosité. Si la contrainte est assez faible, la déformation est réversible, et les mesures sont alors dans le domaine linéaire. Si la contrainte est trop importante, le matériau peut alors être endommagé irréversiblement, et la relation entre contrainte et déformation n'est alors plus reproductible. Nous avons cherché à réaliser nos expériences dans le domaine linéaire.

Afin de caractériser les propriétés mécaniques d'un matériau dans le domaine linéaire, un cisaillement oscillant correspondant à une déformation  $\gamma(t) = \gamma_0 \cos(\omega t)$  d'amplitude  $\gamma_0$  et de pulsation  $\omega$  connues est appliqué à différentes fréquences. Notons que la déformation est sans unité, car elle est égale au déplacement dû au cisaillement divisé par la hauteur de l'échantillon. La contrainte  $\sigma(t)$  correspondant à cette déformation est mesurée. En notation

complexe,  $\gamma(t) = \gamma_0 e^{i\omega t}$  et la contrainte et la déformation sont liées entre elles par la relation [115]:

$$\sigma(t) = G^* \gamma(t) = [G'(\omega) + iG''(\omega)]\gamma(t) \quad 2.1$$

où  $G^*$  est le module viscoélastique complexe. La partie réelle de ce module,  $G'$ , est appelée module élastique, et  $G''$ , la partie imaginaire, est appelée module visqueux. Si on écrit que  $\gamma(t) = \gamma_0 e^{i\omega t}$  dans l'équation 2.1, on obtient, en notation réelle :

$$\sigma(t) = G^* \gamma(t) = \gamma_0 [G'(\omega) \cos(\omega t) - G''(\omega) \sin(\omega t)] \quad 2.2$$

Comme, en notation réelle,  $\gamma(t) = \gamma_0 \cos(\omega t)$ , l'équation 2.2 peut également s'écrire [115]:

$$\sigma(t) = G' \dot{\gamma}(t) + \frac{G''}{\omega} \ddot{\gamma}(t) \quad 2.3$$

Pour un matériau purement élastique, l'équation 2.3 s'écrit  $\sigma(t) = G' \dot{\gamma}(t)$ , ce qui justifie l'utilisation de  $G'$  pour caractériser l'élasticité d'un matériau. La contrainte  $\sigma(t)$  est alors proportionnelle à la déformation  $\gamma(t)$ .

Pour un matériau purement visqueux, elle s'écrit  $\sigma(t) = \frac{G''}{\omega} \ddot{\gamma}(t)$ , ce qui justifie l'utilisation de  $G''$  pour caractériser la viscosité d'un matériau. La contrainte  $\sigma(t)$  est alors proportionnelle au taux de déformation  $\dot{\gamma}(t)$ .

Lors d'une déformation, l'énergie peut être emmagasinée par élasticité ou dissipée par viscosité.

Considérons la partie élastique de l'équation 2.3 :  $\sigma(t) = G' \dot{\gamma}(t)$ . L'énergie élastique emmagasinée par unité de volume par un matériau déformé de 0 à  $\gamma_0$  est égale à [115]:

$$E_{elas}(t) = \int_0^{\gamma_0} G' \gamma d\gamma = G' \frac{\gamma_0^2}{2} \quad 2.4$$

Cette énergie élastique emmagasinée est proportionnelle à  $G'$ .

De même, considérons la partie visqueuse de l'équation 2.3 :  $\sigma(t) = \frac{G''}{\omega} \ddot{\gamma}(t)$ . Quand une déformation sinusoïdale est appliquée à un matériau, l'énergie volumique perdue par dissipation visqueuse sur une période est égale à [115]:

$$E_{visc}(t) = \int_0^{2\pi/\omega} \frac{G''}{\omega} \ddot{\gamma}(t) \frac{d\gamma}{dt} dt = \int_0^{2\pi/\omega} [-G'' \gamma_0 \sin(\omega t)] [-\gamma_0 \omega \sin(\omega t)] dt = G'' \pi \gamma_0^2 \quad 2.5$$

Cette énergie perdue par dissipation visqueuse est proportionnelle à  $G''$ .

### 2.3.1.2. Le rhéomètre

Un rhéomètre, utilisé en mode d'oscillation, permet de mesurer le module viscoélastique complexe. L'échantillon est placé entre deux plaques, qui ont une géométrie définie, par exemple une géométrie plan-plan, comme celle qui sera utilisée pour la mésogée des méduses. Dans une géométrie plan-plan, l'échantillon est placé entre deux disques de métal de quelques centimètres de diamètre, séparés entre eux de quelques millimètres. Comme les propriétés mécaniques peuvent dépendre de la température, un thermostat permet de fixer la température des plaques, et donc de l'échantillon. Afin d'imposer une déformation sinusoïdale, comme décrit dans la partie précédente, le disque supérieur oscille autour de son axe. Le rhéomètre contrôle et mesure le couple, l'angle de rotation, et la vitesse angulaire, et en déduit la contrainte, la déformation, et le taux de déformation [35,115]. Dans le domaine linéaire, si la déformation s'exprime comme  $\gamma(t) = \gamma_0 \cos(\omega t)$ , la contrainte s'exprime alors comme :

$$\sigma(t) = \sigma_0(\omega) \cos(\omega t + \delta(\omega)) \quad 2.6$$

où  $\sigma_0(\omega)$  est l'amplitude de la contrainte, et  $\delta(\omega)$  le décalage de phase.  $G'$  et  $G''$  peuvent être déduits des mesures de l'amplitude de la contrainte et du décalage de phase. En effet, si on combine les équations 2.2 et 2.6, on trouve que  $G' = \frac{\sigma_0(\omega)}{\gamma_0} \cos \delta(\omega)$  et  $G'' = \frac{\sigma_0(\omega)}{\gamma_0} \sin \delta(\omega)$ .

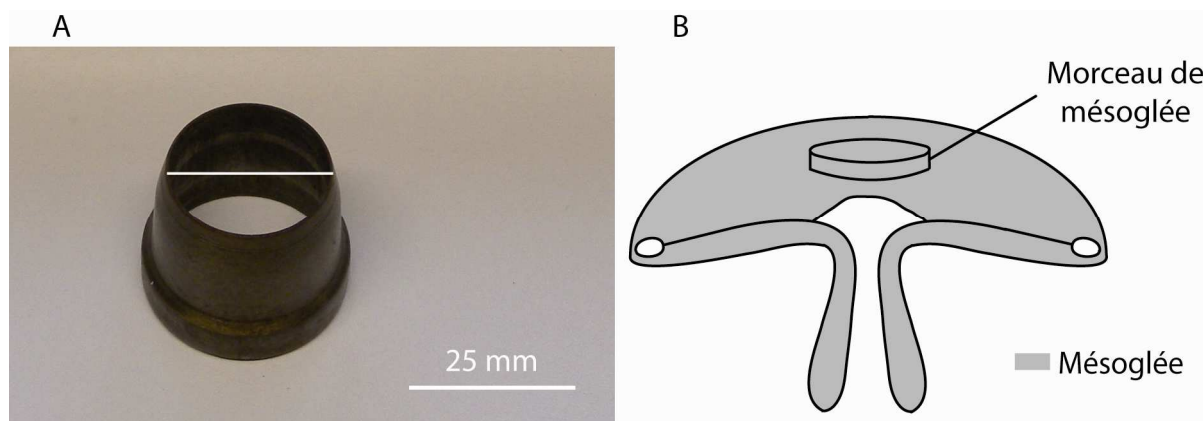
Ainsi, les mesures du déphasage  $\delta(\omega)$ , ainsi que du rapport des amplitudes  $\frac{\sigma_0(\omega)}{\gamma_0}$  entre  $\gamma(t)$  et  $\sigma(t)$ , permettent de déduire  $G'$  et  $G''$  [35,115].

Le rhéomètre peut fixer l'amplitude de la déformation ou de la contrainte, ou la fréquence. Afin d'éviter que l'échantillon glisse, des plaques rugueuses peuvent être utilisées.

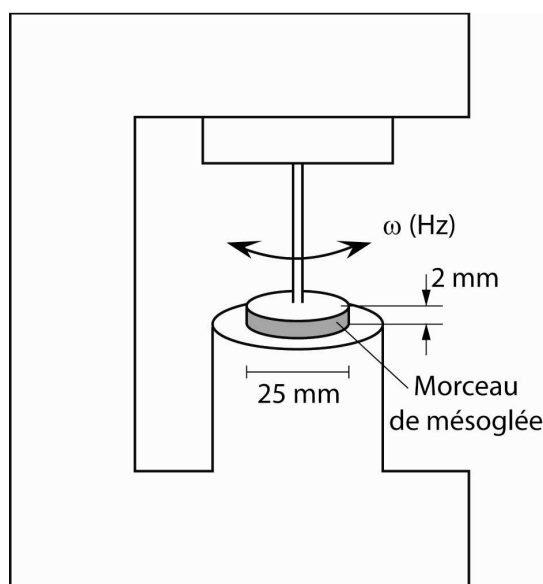
### 2.3.2. Protocole

Les expériences de rhéologie ont été réalisées au moyen d'un rhéomètre (TA Instruments, réf ARES G2), dont Alain Ponton nous a expliqué le fonctionnement. Nous avons mesuré les propriétés mécaniques de la mésogée des méduses *Aurelia aurita* adultes avec une géométrie plan-plan. Pour ce faire, nous avons découpé la mésogée des méduses adultes, afin d'obtenir des cylindres d'environ 25 mm de diamètre et 2 mm de haut. Ces tranches fraîches de mésogée ont été prélevées sur des méduses vivantes, au milieu de la mésogée, dans la zone des fibres verticales, loin des tissus cellulaires ectodermiques et endodermiques. Les échantillons ont été découpés à l'aide d'un cylindre de métal creux, permettant d'obtenir des tranches de mésogée de diamètre contrôlé, de 25 mm de diamètre (figure 2.7).

Les mesures ont été réalisées à 20°C, avec une géométrie plan-plan, un diamètre de disques de 25 mm, et un espacement entre les disques d'environ 2 mm (figure 2.8). Afin d'éviter tout glissement de l'échantillon, nous avons utilisé des disques rugueux, et appliqué une faible force normale constante pendant toute la durée de l'expérience. Un cache humide, placé autour de l'échantillon, permettait d'éviter autant que possible toute évaporation.



**Figure 2.7** – À gauche (A) : photo du cylindre de métal creux permettant de découper un cylindre de mésoglée dans une méduse adulte. À droite (B) : schéma d'une méduse adulte et du cylindre de mésoglée prélevé pour les expériences de macrorhéologie.

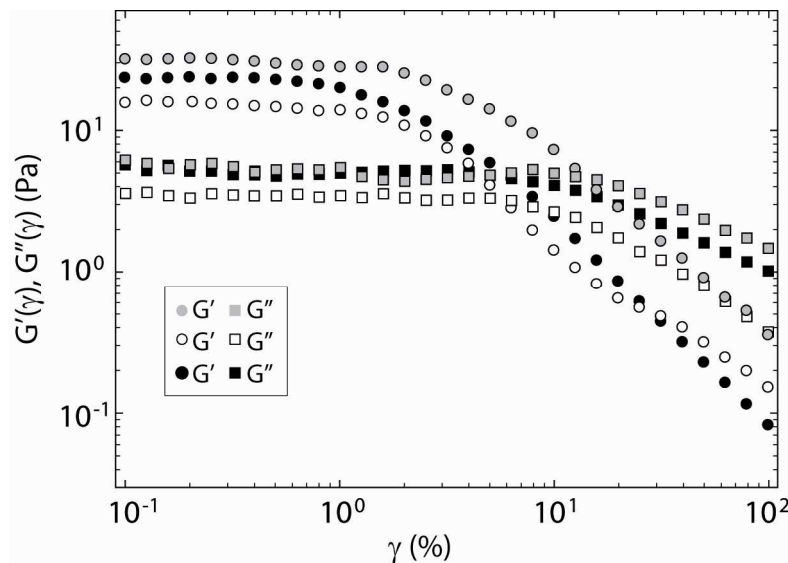


**Figure 2.8** – Schéma d'un morceau de mésoglée dans un rhéomètre plan-plan pour les expériences de cisaillement.

Les modules élastiques et visqueux ont été déterminés par des mesures en oscillation : une déformation sinusoïdale, de fréquence connue, est appliquée ; la contrainte correspondante est mesurée, puis, à partir de ces mesures,  $G'$  et  $G''$  sont calculés (voir le paragraphe précédent).

Afin que les échantillons ne soient pas endommagés par nos mesures, nous avons cherché à nous placer dans le domaine linéaire, donc à de faibles déformations. Afin de déterminer la plage de déformations correspondant à ce domaine, nous avons mesuré  $G'$  et  $G''$  à une fréquence d'oscillation fixée ( $f = 1$  Hz), et des déformations croissantes (de 0.01 à 100%). La zone où  $G'$  et  $G''$  sont indépendants de la déformation correspond à la zone linéaire. Au-delà,  $G'$  et  $G''$  diminuent quand la déformation augmente, et ne correspondent donc plus à des

caractéristiques intrinsèques du matériau permettant d'établir une correspondance entre contrainte et déformation indépendamment de la valeur de la déformation (ou de la contrainte). Dans la zone linéaire,  $G'$  et  $G''$  ne dépendent que de la fréquence de déformation à laquelle le matériau est soumis. La figure 2.9 présente les mesures de  $G'$  et  $G''$  en fonction de la déformation, obtenues pour différentes tranches de mésoglée, à une fréquence d'oscillation de 1 Hz. Nous pouvons observer que  $G'$  et  $G''$  sont quasiment indépendants de la déformation appliquée, tant que cette dernière reste inférieure à 1%. Au-delà,  $G'$  et  $G''$  décroissent avec la déformation. Les morceaux de mésoglée sont donc dans le régime linéaire pour des déformations  $\gamma < 1\%$ .



**Figure 2.9** – Modules élastiques  $G'$  (cercles) et visqueux  $G''$  (carrés) en fonction de la déformation, à une fréquence d'oscillation de 1 Hz. Chaque courbe  $G'$  et  $G''$  correspond à une expérience faite avec un échantillon de mésoglée différent.

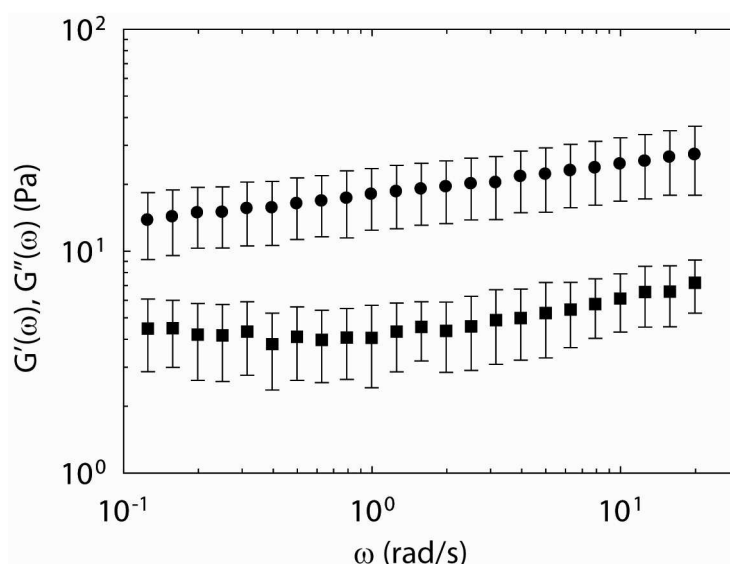
### 2.3.3. Résultats

Après avoir déterminé que le régime linéaire correspondait à des déformations inférieures à 1%, nous avons choisi d'effectuer nos mesures de  $G'$  et  $G''$  à une valeur de déformation de 0.3% : cette valeur est inférieure à 1%, pour s'assurer d'être dans le régime linéaire, sans être trop faible, afin que les déformations soient suffisantes et les mesures associées fiables.

Nous avons mesuré la dépendance en fréquence des modules élastique ( $G'$ ) et visqueux ( $G''$ ) à une valeur de déformation de 0.3%, et pour des pulsations de 0.13 à 20 rad/s. Les expériences ont été faites sur 18 tranches différentes de mésoglée, provenant de 6 méduses adultes. Chaque morceau de mésoglée avait été découpé dans la même zone : la région traversée par les fibres larges verticales. Chaque échantillon présentait le même comportement mécanique : dans la gamme de fréquences étudiée,  $G'$  était supérieur à  $G''$ , et  $G'$  augmentait légèrement

avec la fréquence. Nous avons observé une variabilité des résultats relativement faible entre les différents échantillons. Sur la figure 2.10, nous avons tracé les valeurs moyennes de  $G'$  et  $G''$  en fonction de la fréquence ; les barres représentent les écarts quadratiques moyens, traduisant la variabilité entre les différents échantillons.

Les résultats des expériences de macrorhéologie, présentés sur la figure 2.10, montrent que la mésoglée est un matériau viscoélastique [155]. Dans la gamme de fréquences étudiée,  $G'$  est supérieur à  $G''$ , et la mésoglée est donc un matériau plus élastique que visqueux. Entre 1 et 20 rad/s,  $G'$  et  $G''$  augmentent en fonction de la fréquence en suivant une loi de puissance identique, caractérisée par un exposant voisin de 0.16. Des comportements en loi de puissance, qui sont la signature d'un gel, ont été observés dans de nombreux polymères [158], notamment des biopolymères [131]. Le comportement en fréquence des modules élastiques et visqueux de la mésoglée d'*Aurelia aurita* est très voisin de celui de gels de collagène (voir le paragraphe 2.5.1.1.).



**Figure 2.10** – Modules élastiques  $G'$  (cercles) et visqueux  $G''$  (carrés) de la mésoglée en fonction de la pulsation, à une déformation de 0.3 %. Les courbes correspondent à des moyennes faites sur 18 tranches différentes de mésoglée. Les barres correspondent aux écarts quadratiques moyens, qui traduisent la dispersion des mesures.

Une comparaison avec d'autres études mécaniques menées sur la mésoglée de méduses n'est pas évidente. En effet, si les travaux concernant l'étude de la composition ou de la structure de la mésoglée sont nombreux, rares sont ceux qui traitent de ses propriétés rhéologiques. Nous avons relevé les travaux d'Alexander [6], qui a étudié le fluage de la mésoglée, et ceux de McGill et al. [106], qui ont étudié son élasticité en compression. Alexander étudiait les propriétés mécaniques des méduses dans le domaine non linéaire : leur mésoglée était étirée quasiment d'un facteur deux [6]. C'est pourquoi il nous est difficile de comparer ses résultats aux nôtres, qui sont obtenus par des mesures d'oscillations dans le domaine linéaire.

Cependant, nous pouvons, dans une certaine mesure, les comparer aux résultats obtenus par Megill et al. [106]. En effet, ces auteurs, par des mesures de compression, ont trouvé un module de Young moyen de 340 Pa dans la mésoglée de *Polyorchis penicillatus*. Si une comparaison exacte de cette valeur avec nos mesures de macrorhéologie n'est pas possible, nous pouvons estimer grossièrement le module élastique de la mésoglée de *Polyorchis penicillatus* à partir de son module de Young mesuré par Megill et al., et le comparer à nos mesures. Si on considère en première approximation, que la mésoglée, malgré ses propriétés visqueuses et l'orientation des fibres larges qui la compose, peut être vue comme un matériau purement élastique, isotrope et incompressible, la valeur de son module élastique serait égale au tiers de son module de Young [115]: le module élastique de la mésoglée de *Polyorchis penicillatus* serait d'environ 110 Pa. Si nous avons mesuré un module élastique plus faible chez *Aurelia aurita* (voisin de 20 Pa à une pulsation de 1 rad/s), les ordres de grandeur de ces modules élastiques sont voisins. La différence peut provenir de la différence de taille et de forme entre *Aurelia aurita* et *Polyorchis penicillatus*, conduisant à une organisation fibreuse [160] et à des propriétés mécaniques différentes : *Aurelia aurita* a la forme d'une soucoupe, de 10 cm de diamètre, et *Polyorchis penicillatus* a la forme d'une petite torpille de 3 cm de diamètre [106,160].

## **2.4. Propriétés mécaniques microscopiques de la mésoglée**

Si les quelques études réalisées précédemment sur les propriétés mécaniques de la mésoglée se sont toujours intéressées à l'échelle macroscopique, aucune étude rhéologique n'avait auparavant été réalisée à l'échelle microscopique. Cependant, l'étude du rôle des propriétés mécaniques de la mésoglée dans la morphogenèse requiert une étude rhéologique à l'échelle cellulaire, que nous avons réalisée grâce à une technique de microrhéologie, et que nous présentons dans la partie suivante. Le principe de cette technique, le matériel expérimental à utiliser, ainsi que les techniques d'interprétation des résultats, nous ont été donnés par Bérengère Abou, qui est une spécialiste de microrhéologie, et avec qui nous avons travaillé en collaboration. Elle utilise cette technique pour mesurer les propriétés viscoélastiques de liquides biologiques [3], ou pour étudier des phénomènes hors équilibre, comme la transition vitreuse [1,2,32]. Nous exposerons tout d'abord le principe de la microrhéologie, puis le protocole utilisé, les résultats, et enfin les expériences de contrôle.

### **2.4.1. La microrhéologie**

#### **2.4.1.1. Principe et utilisations**

Les techniques de microrhéologie ont été largement utilisées ces dernières années, afin de mesurer les propriétés viscoélastiques de gels mous ou d'échantillons biologiques à l'échelle

du micron [22,100]. Ces techniques permettent d'étudier les propriétés mécaniques de tissus, de cellules [39,50,104,156,161], de sécrétions biologiques dont on ne dispose que d'un faible volume [3], et permettent de mesurer les hétérogénéités de l'échantillon [148,154]. Des microsondes (billes, aiguilles...) sont insérées dans l'échantillon, et permettent de mesurer, à l'échelle microscopique, la relation entre contrainte (*via* la force exercée par la sonde) et déformation (*via* la position de la sonde). Afin d'appliquer une force sur l'échantillon, la sonde peut être manipulée de diverses façons : par des interactions magnétiques [93], ou par piégeage laser [155]. Il est aussi possible de se passer d'une excitation externe et d'utiliser le mouvement brownien intrinsèque des microsondes [103]. Dans ce cas, la force motrice est thermique. La position de la sonde peut être mesurée par visualisation au microscope [3], ou par des techniques de diffusion dynamique de la lumière [103,116].

Dans le cadre de notre travail, nous avons mesuré les propriétés mécaniques de la matrice extracellulaire en injectant des microbilles et en enregistrant leur mouvement brownien visualisé au microscope. La force motrice est thermique, avec une énergie de l'ordre de  $k_B T$ ,  $k_B$  étant la constante de Boltzmann et  $T$  la température, exprimée en Kelvin. Cette force étant faible, la réponse viscoélastique est mesurée dans le domaine linéaire. Les modules élastiques ( $G'$ ) et visqueux ( $G''$ ) locaux peuvent être déduits des déplacements quadratiques moyens des microbilles [101].

#### 2.4.1.2. *Théorie sous-jacente*

Présentons à présent les éléments de théorie qui permettent de comprendre le lien entre le déplacement quadratique moyen d'une microbille et les modules élastiques ( $G'$ ) et visqueux ( $G''$ ) de son environnement local. Nous nous placerons tout d'abord dans le cas simplifié d'un fluide purement visqueux, donc de module élastique nul, puis nous généraliserons au cas d'un fluide viscoélastique.

##### Cas du fluide purement visqueux

Considérons une microbille immergée dans un fluide purement visqueux. Cette bille a un mouvement brownien, dû aux nombreuses collisions avec des particules du fluide. Le mouvement de la microbille dans le fluide visqueux peut être décrit par une équation de Langevin. Pour simplifier, nous considérons le cas unidimensionnel (les résultats pourront ensuite être généralisés au cas tridimensionnel). Le principe fondamental de la dynamique conduit à l'équation de Langevin unidimensionnelle [123]:

$$m \frac{dv}{dt} = F(t) - m\zeta v(t) \quad 2.7$$



où  $m$  et  $v(t)$  sont la masse et la vitesse de la bille.

$m\zeta v(t)$  correspond au terme de dissipation visqueuse. Le coefficient  $m\zeta$  est lié à la viscosité du fluide  $\eta$  et au rayon de la bille  $R$  par la loi de Stokes. Cette dernière permet en effet d'exprimer les forces de frictions  $\vec{F}_v$  subies par une bille de rayon  $R$  en déplacement à une vitesse  $\vec{v}$  dans un fluide de viscosité  $\eta$  de la façon suivante :

$$\vec{F}_v = -6\pi\eta R\vec{v} \rightarrow m\zeta = 6\pi\eta R \quad 2.8$$

$F(t)$  est une force aléatoire, résultant des nombreuses collisions avec les particules du fluide. Nous posons que cette force a une distribution gaussienne de moyenne nulle :

$$\langle F(t) \rangle = 0 \quad 2.9$$

Les crochets indiquent une moyenne sur un grand nombre de billes, situées toutes dans le même environnement macroscopique, dont sont connus les paramètres thermodynamiques, comme la température. Nous supposons également que l'échelle de temps caractéristique de variation de  $F(t)$  est bien plus courte que l'échelle de temps caractéristique du mouvement des billes. En conséquence, les distributions des forces à deux instants donnés sont découplées. Cela peut être exprimé mathématiquement de la façon suivante :

$$\langle F(t)F(t') \rangle = g\delta(t' - t) \quad 2.10$$

où  $\delta(t)$  est une fonction de Dirac, et  $g$  une constante.

Si la position initiale de la bille est notée  $x_0$  et sa vitesse initiale  $v_0$ , la résolution de l'équation de Langevin (équation 2.7) conduit à l'expression suivante de la vitesse de la bille en fonction du temps :

$$v(t) = v_0 e^{-\zeta t} + \frac{1}{m} \int_0^t e^{-\zeta(t-t')} F(t') dt' \quad 2.11$$

Nous pouvons déduire de l'équation 2.11 l'expression de la vitesse quadratique moyenne en fonction du temps  $\langle \Delta v^2(t) \rangle$  :

$$\langle \Delta v^2(t) \rangle = \langle v(t)^2 \rangle - \langle v(t) \rangle^2 = \frac{g}{2m^2 \zeta} (1 - e^{-2\zeta t}) \quad 2.12$$

L'équation 2.12 montre que la vitesse quadratique moyenne atteint une constante à temps long :

$$\lim_{t \rightarrow \infty} \langle \Delta v^2(t) \rangle = \langle \Delta v^2(\infty) \rangle = \frac{g}{2m^2 \zeta} \quad 2.13$$

À temps long, la vitesse moyenne de la bille est nulle ( $\langle v(\infty) \rangle = 0$ ), et la bille est en équilibre avec son environnement, qui est à température  $T$ . Le théorème d'équipartition de l'énergie à une dimension conduit par conséquent à :

$$\frac{1}{2}m\langle \Delta v^2(\infty) \rangle = \frac{1}{2}m\langle v^2(\infty) \rangle = \frac{1}{2}k_B T = \frac{g}{4m\zeta} \quad 2.14$$

où  $k_B$  est la constante de Boltzmann.

L'équation 2.14 relie la friction à la température.

Nous pouvons à présent exprimer le déplacement quadratique moyen de la bille en fonction de la viscosité et de la température. Si la condition initiale de la position est fixée à  $x_0 = 0$ , l'intégration de l'équation 2.11 conduit à :

$$x(t) = x_0 \frac{1 - e^{-\zeta t}}{\zeta} + \frac{1}{m} \int_0^t dt' \int_0^{t'} dt'' e^{-\zeta(t'-t'')} F(t'') \quad 2.15$$

Nous pouvons déduire de l'équation 2.15 que :

$$\langle \Delta x^2(t) \rangle = \langle x(t)^2 \rangle - \langle x(t) \rangle^2 = \frac{g}{m^2 \zeta^2} \left[ t - 2 \frac{1 - e^{-\zeta t}}{\zeta} + \frac{1 - e^{-2\zeta t}}{2\zeta} \right] \quad 2.16$$

L'équation 2.16 montre qu'à temps long, les billes ont un mouvement diffusif, caractérisé par un coefficient de diffusion  $D$  :

$$\langle \Delta x^2(t) \rangle = \frac{g}{m^2 \zeta^2} t = 2Dt \quad \rightarrow \quad D = \frac{g}{2m^2 \zeta^2} \quad 2.17$$

Afin d'exprimer  $D$  en fonction de  $T$ , et non en fonction de  $g$ , que l'on ne peut pas mesurer, nous combinons les équations 2.14 et 2.17, et obtenons :

$$D = \frac{k_B T}{m\zeta} \quad 2.18$$

Nous pouvons également exprimer  $D$  en fonction de la mobilité  $\mu$ . Si on applique une force externe  $F_0$  sur la bille, sa vitesse résultante sera  $v = \mu F_0$ . La loi de Stokes,  $F_0 = 6\pi\eta Rv$ , conduit à lier la mobilité au terme de dissipation visqueuse de la façon suivante:  $\mu = \frac{1}{6\pi\eta R} = \frac{1}{m\zeta}$ . Par conséquent, nous pouvons déduire de l'équation 2.18 l'équation d'Einstein :

$$\frac{D}{\mu} = k_B T \quad 2.19$$

Afin de mesurer la viscosité du fluide par l'observation du mouvement brownien des billes, nous cherchons à exprimer la relation entre la viscosité et le déplacement quadratique moyen. La loi de Stokes (équation 2.8), et les équations 2.17 et 2.18 conduisent à :

$$\langle \Delta x^2(t) \rangle = \frac{k_B T}{3\pi\eta R} t \quad 2.20$$

L'équation 2.20 est à une dimension, et peut être généralisée à d-dimensions ainsi :

$$\langle \Delta r^2(t) \rangle = \frac{d k_B T}{3\pi\eta R} t \quad 2.21$$

L'équation 2.21 montre que si la température du fluide et le diamètre de la microbille sont connus, nous pouvons déduire la viscosité du fluide purement visqueux environnant de la mesure du déplacement quadratique moyen en fonction du temps.

### Cas du fluide viscoélastique

Considérons une microbille immergée dans un fluide viscoélastique. Son mouvement peut être décrit par une équation de Langevin. Pour simplifier, nous considérons le cas unidimensionnel (les résultats pourront ensuite être généralisés au cas tridimensionnel). Le principe fondamental de la dynamique conduit à l'équation de Langevin unidimensionnelle [103,123]:

$$m \frac{dv}{dt} = F(t) - \int_0^t m \zeta(t-t') v(t') dt' \quad 2.22$$

où  $m$  et  $v(t)$  sont la masse et la vitesse de la bille. Cette équation (équation 2.22) permet de prendre en compte l'élasticité et la viscosité du milieu par l'intégration de la fonction de mémoire temporelle  $m\zeta(t)$ . Cette fonction correspond à la dissipation visqueuse (de manière analogue au terme vu dans le paragraphe précédent, équation 2.7), et son intégration rend compte de l'histoire des forces appliquées à la particule, et de la possibilité que l'énergie emmagasinée dans le milieu environnant à un instant donné soit retournée à la particule ultérieurement, ce qui correspond au comportement élastique. La borne inférieure de l'intégrale est 0, instant auquel la bille a été introduite dans le fluide. Comme dans le paragraphe précédent,  $F(t)$  est une force aléatoire, résultant des nombreuses collisions avec les particules du fluide. Nous posons que cette force a une distribution gaussienne de

moyenne nulle. La vitesse de la bille à un instant  $t$  est le résultat des nombreuses collisions avec des particules du fluide aux instants précédents. Cela implique que la distribution des vitesses au temps  $t_1$  est découplée de la distribution des forces aléatoires aux temps  $t_2 > t_1$ . Cela peut être exprimé mathématiquement de la manière suivante :

$$\langle v_0 F(t) \rangle = 0 \quad \text{pour} \quad t > 0 \quad 2.23$$

Comme précédemment, les crochets indiquent une moyenne sur un grand nombre de billes, situées toutes dans le même environnement macroscopique, dont sont connus les paramètres thermodynamiques, comme la température. Nous posons que les billes sont initialement au repos :

$$\langle x(0) \rangle = 0 \quad \text{et} \quad \langle v(0) \rangle = 0 \quad 2.24$$

Multiplier les deux membres de l'équation 2.22 par  $v(0)$ , lui appliquer une moyenne d'ensemble, puis prendre en compte l'équation 2.23 conduit à la relation suivante :

$$\left\langle \frac{dv}{dt} v(0) \right\rangle = - \int_0^t \zeta(t-t') \langle v(t') v(0) \rangle dt' \quad 2.25$$

En appliquant la transformation de Laplace à l'équation 2.25, nous pouvons obtenir une relation entre la fonction de mémoire  $\zeta(t)$  et la fonction d'autocorrélation de la vitesse  $\langle v(t)v(0) \rangle$ .

Rappelons l'expression de la transformée de Laplace  $\tilde{f}(s)$  d'une fonction  $f(t)$  :

$$\tilde{f}(s) = \int_0^\infty f(t) e^{-st} dt \quad 2.26$$

Le terme de gauche de l'équation 2.25 devient :

$$\begin{aligned} \int_0^\infty \left\langle \frac{dv}{dt} v(0) \right\rangle e^{-st} dt &= \left[ e^{-st} \langle v(t) v(0) \rangle \right]_0^\infty + \int_0^\infty s e^{-st} \langle v(t) v(0) \rangle dt \\ &= s \langle \tilde{v}(s) v(0) \rangle - \langle v(0)^2 \rangle \end{aligned} \quad 2.27$$

où  $\tilde{v}(s)$  est la transformée de Laplace de  $v(t)$ . Le terme de droite de l'équation 2.25 est une convolution, sa transformée de Laplace est  $-\tilde{\zeta}(s) \langle \tilde{v}(s) v(0) \rangle$  de telle sorte que la transformée de Laplace de l'équation 2.25 conduit à :

$$\langle \tilde{v}(s) v(0) \rangle = \frac{\langle v(0)^2 \rangle}{s + \tilde{\zeta}(s)} \quad 2.28$$

Le théorème d'équipartition de l'énergie relie la température à la vitesse moyenne des billes. Il peut être écrit, à une dimension, de la façon suivante :  $\frac{1}{2} m \langle v(0)^2 \rangle = \frac{1}{2} k_B T$ , où  $T$  est la température du système et  $k_B$  la constante de Boltzmann. Insérer cette relation dans l'équation 2.28 conduit à la relation :

$$\langle \tilde{v}(s)v(0) \rangle = \frac{k_B T}{ms + m\tilde{\zeta}(s)} \quad 2.29$$

Le terme d'inertie de l'équation 2.29 est négligeable, mis à part à très haute fréquence (MHz), si bien que l'équation 2.29 devient :

$$\langle \tilde{v}(s)v(0) \rangle = \frac{k_B T}{m\tilde{\zeta}(s)} \quad 2.30$$

La fonction d'autocorrélation de la vitesse peut être exprimée en fonction du déplacement quadratique moyen  $\langle \Delta x^2(t) \rangle$  [102]. En une dimension, on obtient :

$$\langle v(t)v(0) \rangle = \frac{1}{2} \frac{\partial^2 \langle \Delta x^2(t) \rangle}{\partial t^2} \quad 2.31$$

Comme les billes sont immobiles à l'instant  $t = 0$  (équation 2.24), nous obtenons, après une transformation de Laplace de l'équation 2.31:

$$\langle \tilde{v}(s)v(0) \rangle = \frac{s^2 \langle \Delta \tilde{x}^2(s) \rangle}{2} \quad 2.32$$

En combinant les équations 2.30 et 2.32, nous obtenons une relation entre la fonction de mémoire et le déplacement quadratique moyen :

$$\tilde{\zeta}(s) = \frac{2k_B T}{ms^2 \langle \Delta \tilde{x}^2(s) \rangle} \quad 2.33$$

Il nous faut à présent établir le lien entre la fonction de mémoire et la viscoélasticité linéaire d'un fluide complexe. Le comportement viscoélastique est complètement décrit par le module de relaxation des contraintes  $G(t)$ , qui lie la contrainte  $\sigma(t)$  à un instant  $t$  au taux de déformation  $\dot{\gamma}(t)$  aux instants passés [115] :

$$\sigma(t) = \int_0^t G(t-t') \dot{\gamma}(t') dt' \quad 2.34$$

La viscosité complexe  $\eta(\omega)$  est définie pour un mouvement oscillatoire par  $\sigma(t) = \eta(\omega)\dot{\gamma}(t)$  et est liée au module de relaxation des contraintes par  $\eta(\omega) = \int_0^\infty G(t)e^{-i\omega t} dt$  [115]. Il apparaît que la viscosité complexe est la transformée de Fourier du module de relaxation des contraintes. Ainsi, si on prend la transformée de Laplace de l'équation 2.34, nous obtenons :

$$\tilde{\sigma}(s) = s\tilde{\eta}(s)\tilde{\gamma}(s) \quad 2.35$$

Le module viscoélastique complexe  $G^*$  est défini pour un mouvement oscillatoire par  $\sigma(t) = G^*(\omega)\gamma(t)$ . Dans le domaine de Laplace, nous obtenons alors la relation suivante :

$$\tilde{G}^*(s) = s\tilde{\eta}(s) \quad 2.36$$

Dans le cas limite d'une suspension diluée de particules sphériques de rayon  $R$ , immergée dans un solvant purement visqueux, le coefficient de friction et la viscosité sont liés par la loi de Stokes :  $\eta = \frac{m\zeta}{6\pi R}$ . Nous posons qu'un fluide viscoélastique obéit au même comportement, et généralisons cette loi à toutes les fréquences [103]:

$$\tilde{\eta}(s) = \frac{m\tilde{\zeta}(s)}{6\pi R} \quad 2.37$$

En combinant les équations 2.36 et 2.37, la loi de Stokes généralisée peut être écrite de la façon suivante :

$$\tilde{G}^*(s) = \frac{sm\tilde{\zeta}(s)}{6\pi R} \quad 2.38$$

En combinant les équations 2.33 et 2.38, nous obtenons la relation recherchée entre le module viscoélastique complexe et le déplacement quadratique moyen :

$$\tilde{G}^*(s) = \frac{k_B T}{3\pi R s \langle \Delta \tilde{x}^2(s) \rangle} \quad 2.39$$

Si on considère un milieu à  $d$ -dimensions l'équation 2.39 peut être écrite de la façon suivante [22]:

$$\tilde{G}^*(s) = \frac{d k_B T}{3\pi R s \langle \Delta \tilde{r}^2(s) \rangle} \quad 2.40$$

L'équation 2.40 est une généralisation de l'équation de Stokes-Einstein pour les fluides complexes.

La plupart des mesures de module viscoélastique passent par une excitation sinusoïdale de l'échantillon à une pulsation  $\omega$ , permettant d'obtenir les modules élastiques  $G'(\omega)$  et visqueux  $G''(\omega)$ . Afin de pouvoir comparer les résultats de microrhéologie et de macrorhéologie,  $\tilde{G}^*(s)$  peut être exprimé dans le domaine de Fourier :  $G^*(\omega)$ . L'équation 2.40 devient alors :

$$G^*(\omega) = \frac{d k_B T}{3\pi R i \omega \langle \Delta \hat{r}^2(\omega) \rangle} \quad 2.41$$

où  $\langle \Delta \hat{r}^2(\omega) \rangle$  est la transformée de Fourier de  $\langle \Delta r^2(t) \rangle$ . La partie réelle de l'équation 2.41 correspond à  $G'(\omega)$  et sa partie imaginaire à  $G''(\omega)$ .

### Interprétation des courbes de déplacement quadratique moyen

Remarquons que l'équation 2.40 permet de retrouver l'équation 2.21 décrivant le comportement diffusif d'une bille dans un milieu purement visqueux.

En effet, dans un fluide purement visqueux, de viscosité donnée  $\eta$ , l'équation 2.3 devient :

$$\sigma(t) = \frac{G''}{\omega} \dot{\gamma}(t) = \eta \dot{\gamma}(t) \quad 2.42$$

Dans le domaine de Laplace, l'équation 2.42 devient :

$$\tilde{\sigma}(s) = \eta s \tilde{\gamma}(s) \quad 2.43$$

Or l'équation 2.35 est :  $\tilde{\sigma}(s) = s \tilde{\eta}(s) \tilde{\gamma}(s)$

Nous en déduisons donc que :

$$\tilde{\eta}(s) = \eta \quad 2.44$$

Or, les équations 2.36 et 2.40 conduisent à :  $\tilde{G}^*(s) = s \tilde{\eta}(s) = \frac{d k_B T}{3\pi R s \langle \Delta \tilde{r}^2(s) \rangle}$

Par conséquent :

$$\langle \Delta \tilde{r}^2(s) \rangle = \frac{d k_B T}{3\pi \eta R s^2} \quad 2.45$$

Dans le domaine temporel, l'équation 2.45 donne :

$$\langle \Delta r^2(t) \rangle = \frac{d k_B T}{3\pi \eta R} t \quad 2.46$$

Nous retrouvons l'équation 2.21, obtenue pour un fluide purement visqueux. L'équation 2.46 montre que dans un milieu purement visqueux, le déplacement quadratique moyen d'une microbille est linéaire au cours du temps [22].

Par ailleurs, dans le cas d'un milieu purement élastique, de module élastique  $G'$ , l'équation 2.3 devient :

$$\sigma(t) = G' \gamma(t) \quad 2.47$$

Dans le domaine de Laplace, l'équation 2.47 devient :

$$\tilde{\sigma}(s) = G' \tilde{\gamma}(s) \quad 2.48$$



Or l'équation 2.35 est :  $\tilde{\sigma}(s) = s\tilde{\eta}(s)\tilde{\gamma}(s)$

Nous en déduisons donc que :

$$\tilde{\eta}(s) = \frac{G'}{s} \quad 2.49$$

Or, les équations 2.36 et 2.40 conduisent à :  $\tilde{G}^*(s) = s\tilde{\eta}(s) = \frac{d k_B T}{3\pi R s \langle \Delta \tilde{r}^2(s) \rangle}$

Par conséquent :

$$\langle \Delta \tilde{r}^2(s) \rangle = \frac{d k_B T}{3\pi R G' s} \quad 2.50$$

Dans le domaine temporel, l'équation 2.50 donne :

$$\langle \Delta r^2(t) \rangle = \frac{d k_B T}{3\pi R G'} \quad 2.51$$

L'équation 2.51 montre que dans un milieu purement élastique, le déplacement quadratique moyen d'une microbille est constant au cours du temps [22].

Ainsi, la pente du déplacement quadratique moyen au cours du temps tracé en échelle logarithmique est de 1 dans un milieu purement visqueux et de 0 dans un milieu purement élastique. Dans un milieu viscoélastique, cette pente se situe entre 0 et 1 [22]. Le mouvement d'une microbille est alors sous-diffusif.

## 2.4.2. Protocole

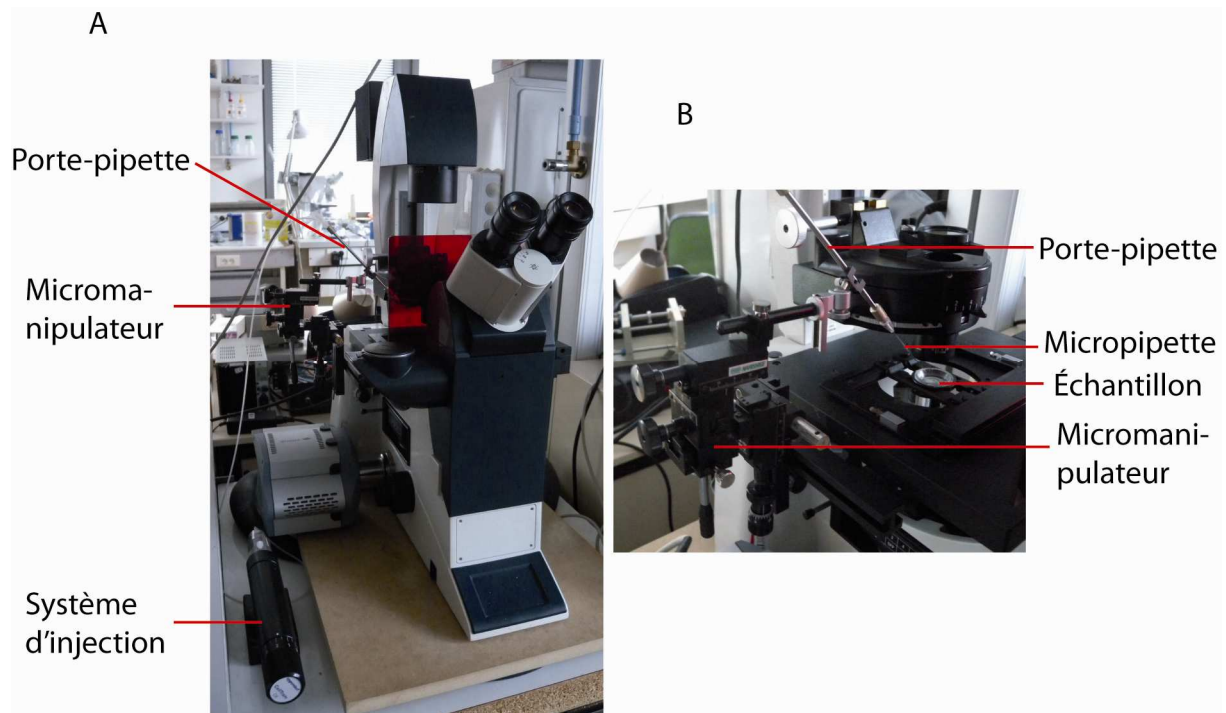
Avoir présenté le principe et la théorie de la microrhéologie, nous souhaitons détailler le protocole permettant de réaliser nos expériences de microrhéologie dans la matrice extracellulaire des méduses. Ce protocole se compose de trois parties : l'injection des microbilles, puis l'observation de leur mouvement brownien, et enfin l'analyse de ce mouvement brownien, afin d'extraire les modules élastiques et visqueux, en se basant sur les éléments de théorie exposés précédemment.

Les expériences ont été réalisées sur des méduses juvéniles (d'environ 1 mois, et 1 cm de diamètre), et des méduses adultes (d'environ 6 mois, et 10 cm de diamètre). Si les méduses juvéniles peuvent être observées *in vivo* au microscope, les méduses adultes sont trop grandes. C'est pourquoi la mésogée de ces dernières a été découpée, dans la région centrale des fibres larges verticales, et les expériences de microrhéologie ont été réalisées sur des morceaux de méduses adultes, alors qu'elles l'ont été *in vivo* pour les méduses juvéniles. Notons toutefois que le fait que ces différences de protocole aient pu affecter les résultats a été étudié dans le cadre de nos expériences de contrôles présentées au paragraphe 2.4.4.

#### 2.4.2.1. Injection

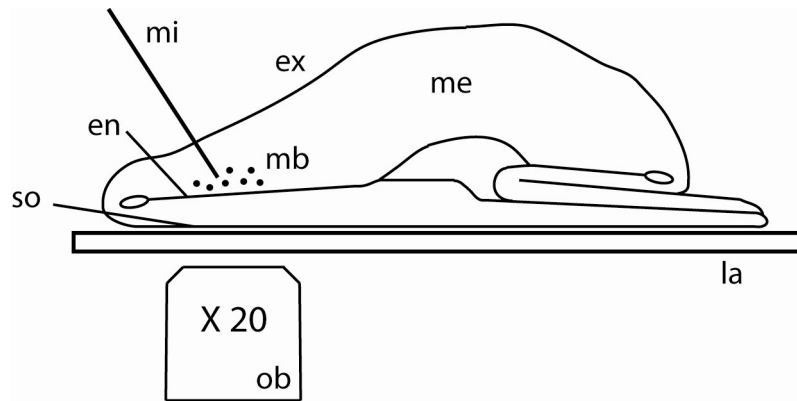
La solution de microbilles utilisée est une solution de microbilles fluorescentes, avec un groupement de surface amine (donc chargées positivement), et ayant un diamètre de 1  $\mu\text{m}$  (Invitrogen, réf F8765). Cette solution a une concentration voisine de  $10^8$  microbilles par millilitre d'eau de mer artificielle.

Cette solution est injectée à l'aide de micropipettes dont l'extrémité a une taille de quelques microns. Elles sont fabriquées au laboratoire, en étirant un capillaire en verre borosilicate, de diamètre externe 1 mm et interne 0.58 mm (Harvard Apparatus, réf GC100-15), au moyen d'un étireur de pipettes (Narishige, réf PB-7). Ces micropipettes sont montées sur un dispositif de microinjection (Eppendorf, CellTram Oil), et sont guidées au moyen d'un micromanipulateur (Narishige, réf MN-151) (figure 2.11).



**Figure 2.11** – Photos du système de microinjection sur le microscope. À gauche (A) : photo d'ensemble. À droite (B) : photo plus en détail.

Les détails de la procédure d'injection sont présentés en figure 2.12.



**Figure 2.12** – Schéma de l'injection de microbilles dans une méduse juvénile. Endoderme (en) ; ex-ombrelle (ex) ; lamelle (la) ; mésoglée (me) ; microbilles (mb) ; micropipette (mi) ; objectif (ob) ; sous-ombrelle (so).

Les méduses juvéniles sont tout d'abord paralysées en les plongeant pendant une dizaine de minutes dans une solution à 7.5% en volume de  $MgCl_2$  diluée dans un rapport 1/1 dans une solution d'eau de mer artificielle. Elles sont ensuite placées sur une lamelle de verre, l'ombrelle étant étalée, et la sous-ombrelle étant en contact avec la lamelle de verre. Cette position de la méduse nous permet d'insérer la pipette dans la mésoglée à travers l'ex-ombrelle (comme représenté sur la figure 2.12). La blessure est ainsi limitée et peut être soignée facilement par la méduse. En effet, une injection à travers la sous-ombrelle aurait endommagé les fibres musculaires, le système gastrovasculaire et l'endoderme.

Quelques nanolitres de la solution de microbilles sont injectés, ce qui correspond à quelques centaines de microbilles. Afin d'éviter à la méduse de sécher, l'injection doit être réalisée aussi rapidement que possible (en 10 minutes environ). Les billes sont injectées dans la mésoglée environ 200  $\mu m$  au-dessus de l'ectoderme de la sous-ombrelle, soit environ 100  $\mu m$  au-dessus de l'endoderme. Elles sont ainsi bien insérées dans la mésoglée, loin des couches cellulaires, mais à une profondeur suffisamment faible (200  $\mu m$ ) pour être inférieure à la distance de travail d'un objectif à immersion de fort grossissement, qui a une résolution suffisante pour la visualisation du mouvement brownien. Nous avons choisi un objectif à immersion, avec un grossissement de 63X, une ouverture numérique de 1.30, et une distance de travail de 280  $\mu m$  (Leica, PL APO 63X/1.30 GLYC CORR).

Nous avons vérifié que l'injection des microbilles ne semblait pas affecter la morphologie et le comportement normal des méduses juvéniles.

Concernant les méduses adultes, des morceaux de mésoglée sont découpés dans la région centrale traversée par les fibres larges verticales, loin des couches cellulaires (environ 1-2 mm au-dessus de l'endoderme). Ces morceaux de mésoglée ne contiennent pas de fibres musculaires, et n'ont donc pas besoin d'être paralysés par du  $MgCl_2$ . Sinon, l'injection se fait comme pour les méduses juvéniles, mis à part qu'elle se fait directement dans la mésoglée, sans avoir à traverser de couches cellulaires.

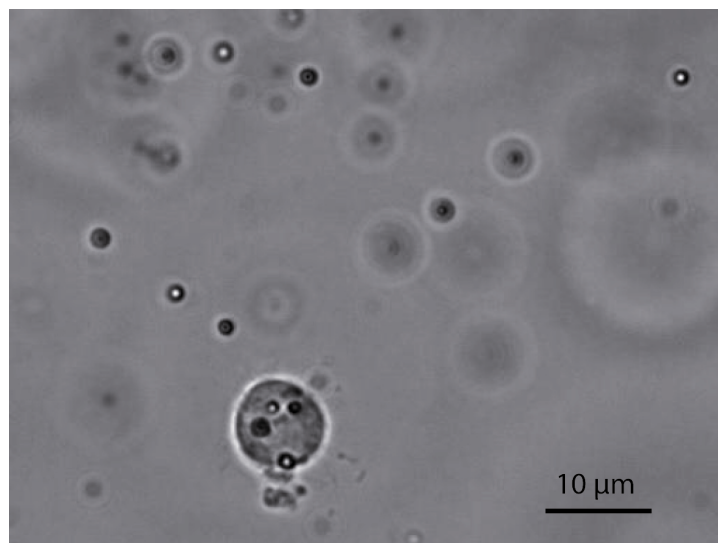
#### 2.4.2.2. *Observations*

##### Quand réaliser les observations ?

Après l'injection, les méduses juvéniles sont replacées dans l'eau de mer artificielle (isolées dans un aquarium conique vide, ou dans un bécher), et nagent librement pendant une journée. L'observation du mouvement brownien des billes n'est réalisée que le lendemain du jour de l'injection.

Nous avons en effet observé que le mouvement brownien des billes juste après l'injection est différent de celui mesuré une journée après, ou plus : juste après l'injection, les microbilles ne sont pas encore toutes bien insérées dans la matrice, et peuvent se trouver dans des poches de la solution d'eau de mer injectée avec elles. Par contre, un jour après injection, le mouvement brownien des microbilles est plus confiné, et nous n'observons plus de mouvement brownien correspondant à des billes dans des poches d'eau. Il est en de même pour les jours suivants : les résultats de microrhéologie obtenus un jour, ou plusieurs jours après injection, sont similaires. Ces résultats seront présentés au paragraphe 2.4.4.1. Ainsi, l'eau de mer injectée avec les microbilles diffuse progressivement, et les billes peuvent alors être insérées localement dans la matrice extracellulaire ; un jour après l'injection, ce processus est achevé.

Par ailleurs, il convient de ne pas attendre trop longtemps entre l'injection des billes et leur observation (pas plus de un ou deux jours), car les cellules mésogléennes phagocytent peu à peu les microbilles (figure 2.13). Ces cellules sont en effet capables de mouvement amiboïde, et de phagocytose [143]. Nous avons observé qu'une semaine après injection, quasiment toutes les billes injectées avaient été phagocytées. Elles sont alors dans des corps cellulaires, ne sont plus dans la matrice extracellulaire, et les expériences ne peuvent plus être réalisées.

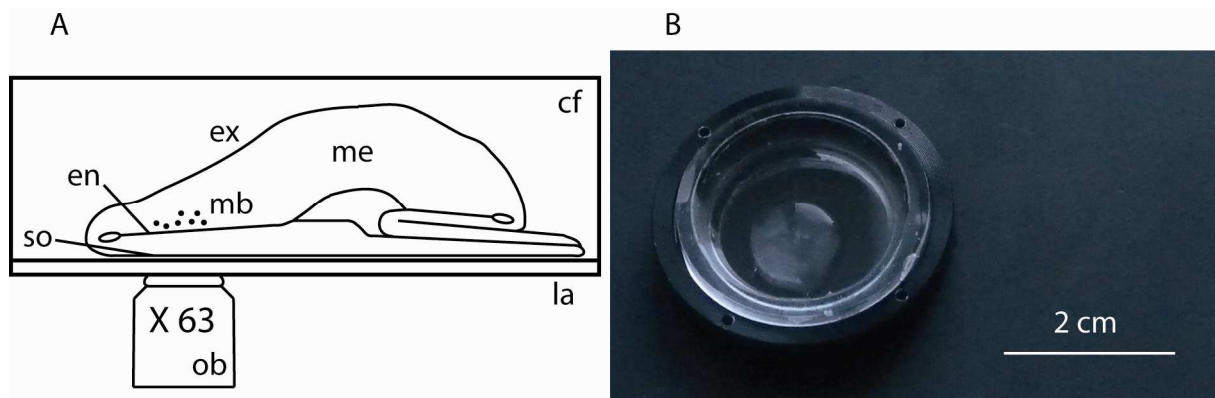


**Figure 2.13** – *Visualisation de microbilles dans la mésoglée et dans une cellule mésogléenne.*

Concernant les morceaux de mésoglée des méduses adultes, nous avons observé, comme dans le cas des méduses juvéniles, que l'observation devait être faite un jour après injection : nous devons attendre que l'eau injectée ait eu le temps de diffuser, et nous devons éviter que les cellules mésogléennes aient phagocyté toutes les microbilles. Ainsi, après l'injection, les morceaux de mésoglée sont conservés pendant une journée au réfrigérateur, pour les préserver des bactéries et permettre la diffusion de l'eau injectée. Nous avons vérifié que la microinjection et le séjour au réfrigérateur n'affectent pas la forme des échantillons et le comportement des cellules mésogléennes. Weber et al. ont d'ailleurs montré que des morceaux de mésoglée peuvent être conservés pendant plusieurs semaines à basse température [159].

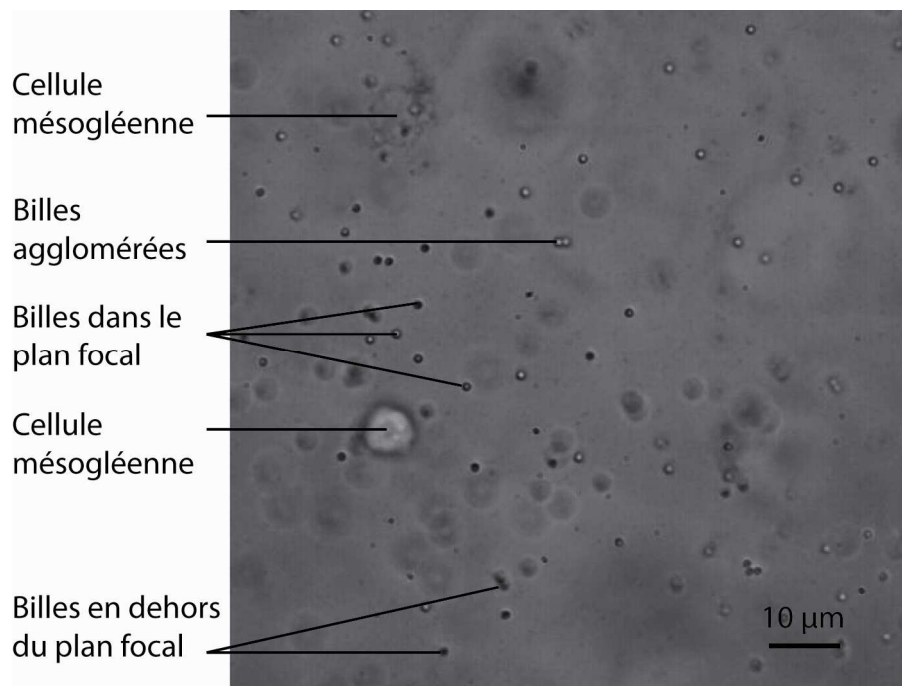
### Comment réaliser les observations ?

Un jour après injection, les méduses juvéniles sont à nouveau paralysées, puis placées sur une lamelle de verre, dans la même position que pour l'injection : leur ombrelle est étalée, et leur sous-ombrelle est placée en contact avec la lamelle de verre (voir figure 2.14). Les morceaux de mésoglée ne sont pas paralysés, et sont simplement déposés sur la lamelle de verre. Une chambre fermée, transparente sur les faces inférieure et supérieure (figure 2.14), est placée autour de l'échantillon, afin d'éviter toute évaporation lors de l'expérience. Le montage expérimental est placé sur une table anti-vibrations, afin de réduire le bruit lors des expériences de suivi du mouvement brownien des microbilles. La fluorescence des microbilles nous permet de retrouver aisément le lieu de l'injection. La fluorescence de ces microbilles étant proche de celle de la 'Green Fluorescent Protein', elle est visualisée au moyen d'un microscope à fluorescence (Leica, DMI 3000 B), équipé de filtres permettant de voir la Green Fluorescent Protein (cube de filtres Leica GFP). Si certaines microbilles ont été phagocytées par les cellules mésogléennes, la plupart sont toujours dans la matrice extracellulaire. Il est très facile de voir si une microbille est dans une cellule ou dans la matrice extracellulaire (figure 2.13), et seules les microbilles insérées dans la matrice sont prises en compte pour les expériences de microrhéologie.



**Figure 2.14** – Visualisation des microbilles dans une méduse juvénile. À gauche (A) : schéma de la visualisation des microbilles. Chambre fermée (cf) ; endoderme (en) ; ex-ombrelle (ex) ; lamelle (la) ; mésoglée (me) ; microbilles (mb) ; objectif (ob) ; sous-ombrelle (so). À droite (B) : photo d'une méduse juvénile dans la chambre fermée.

Le mouvement brownien des microbilles dans la matrice extracellulaire est visualisé à température ambiante ( $T=21^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), en lumière transmise, au moyen de l'objectif à immersion de grossissement 63X. Il est enregistré par une caméra CMOS (Photron, Fastcam-Ultima 1024) à une vitesse de 500 images par secondes pendant 8 secondes, sur un champ de vision de  $100 \times 100 \mu\text{m}^2$ . Entre 5 et 30 microbilles peuvent être visualisées en même temps sur un même champ de vision (figure 2.15). Les billes phagocytées ou agrégées entre elles ne sont pas prises en compte. De plus, afin d'améliorer le rapport signal sur bruit, seules les microbilles situées dans le plan focal de l'objectif, et donc nettes, sont prises en compte (figure 2.15).



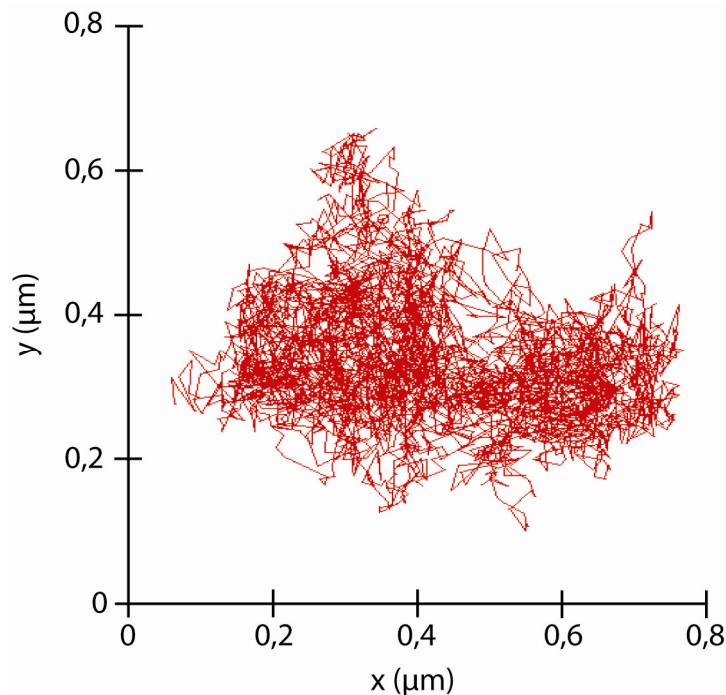
**Figure 2.15** – Visualisation de microbilles dans la mésoglée et dans une cellule mésoglénne.

### 2.4.2.3. Analyse

Une fois que le mouvement brownien des microbilles a été enregistré, il doit être analysé. Dans un premier temps, les images sont analysées informatiquement afin d'extraire la position de chaque microbille en fonction du temps. Puis, un programme permet de corriger le mouvement de translation dû à un inévitable glissement de l'échantillon, ainsi que de calculer le déplacement quadratique moyen de chaque bille. Les modules élastiques et visqueux locaux peuvent ensuite être déduits des déplacements quadratiques moyens.

#### Logiciel de suivi des particules

Un logiciel développé au laboratoire par Olivier Cardoso et Bérengère Abou, sous la forme d'un plugin sous ImageJ [125], permet de suivre le mouvement brownien bidimensionnel de plusieurs microbilles à la fois. Le mouvement des microbilles est suivi grâce à une méthode classique de corrélation croisée. L'algorithme utilisé permet d'obtenir une résolution sur la position des billes inférieure au pixel [3]. La figure suivante montre un exemple de suivi de la position d'une microbille pendant 8 secondes (figure 2.16).



**Figure 2.16** – Trajet du mouvement brownien bidimensionnel d'une microbille dans la mésoglée d'une méduse juvénile pendant 8 s. Le déplacement quadratique moyen de cette bille à  $t = 2$  s est de l'ordre de  $0.1 \mu\text{m}^2$ .



## Correction de la translation et calcul du déplacement quadratique moyen

La méduse juvénile paralysée, ou le morceau de mésoglée, placés sur la lamelle de verre, glissent doucement, en raison de leur forte hydratation. Ce glissement peut être diminué en graissant légèrement la surface du verre afin de la rendre hydrophobe ; mais elle ne doit pas être trop graissée afin de ne pas altérer ses qualités optiques. Un léger glissement ne peut souvent pas être évité, et le mouvement des billes, en sus du mouvement brownien, présente alors une composante de translation à une vitesse de l'ordre de  $0.2 \mu\text{m/s}$ . Nous avons écrit un programme sous Matlab pour supprimer cette composante de translation. Le principe est de calculer le mouvement moyen des microbilles ; si le nombre de billes est suffisamment grand (au moins une dizaine), ce mouvement moyen correspond au mouvement de translation, car la moyenne d'ensemble du mouvement brownien des billes est nulle. Ce mouvement moyen est alors soustrait au mouvement de chacune des billes.

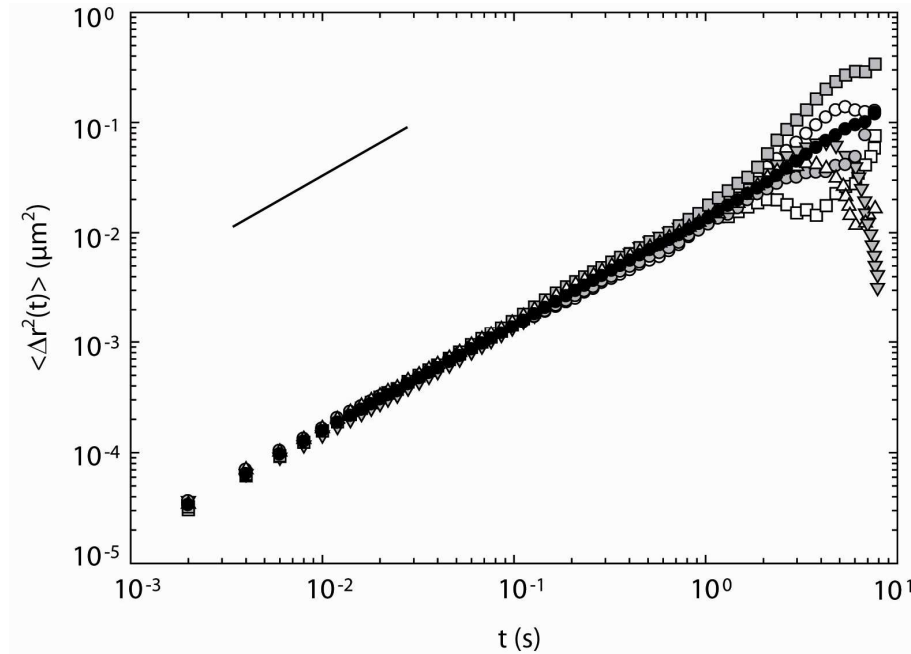
Après cette correction de la translation, le déplacement quadratique moyen bidimensionnel est calculé. Pour chaque bille, de position au cours du temps  $x(t)$  et  $y(t)$ , le déplacement quadratique moyen bidimensionnel s'exprime de la façon suivante :  $\langle \Delta r^2(t) \rangle_t = \langle [x(t' + t) - x(t')]^2 + [y(t' + t) - y(t')]^2 \rangle_t$ . La moyenne est une moyenne temporelle, faite sur le temps d'enregistrement du mouvement brownien des billes, qui est de 8 secondes (donc  $t \leq 8 \text{ s}$  et  $t' + t \leq 8 \text{ s}$ ). Cette moyenne permet d'améliorer la précision statistique. Afin que cette moyenne temporelle puisse être calculée sur un nombre de données suffisant, elle n'est réalisée que pour des temps  $t \leq 2 \text{ s}$ , sur un enregistrement de 8 secondes.

Nous avons réalisé des expériences de microrhéologie dans des solutions de glycérol, afin de vérifier à la fois que notre méthode permettait de soustraire correctement le mouvement de translation, et également pour nous assurer que jusqu'à 2 secondes, la précision statistique était suffisante pour évaluer correctement le déplacement quadratique moyen. Nous avons choisi le glycérol, car c'est un fluide newtonien, purement visqueux, de viscosité connue.

Nous avons réalisé des enregistrements de mouvement brownien des microbilles dans des solutions de glycérol soumises à un mouvement de translation (obtenu par un déplacement manuel léger de la platine du microscope). Nous avons vérifié que notre programme permettait d'extraire le mouvement de translation et de retrouver le déplacement quadratique moyen correspondant au mouvement brownien original.

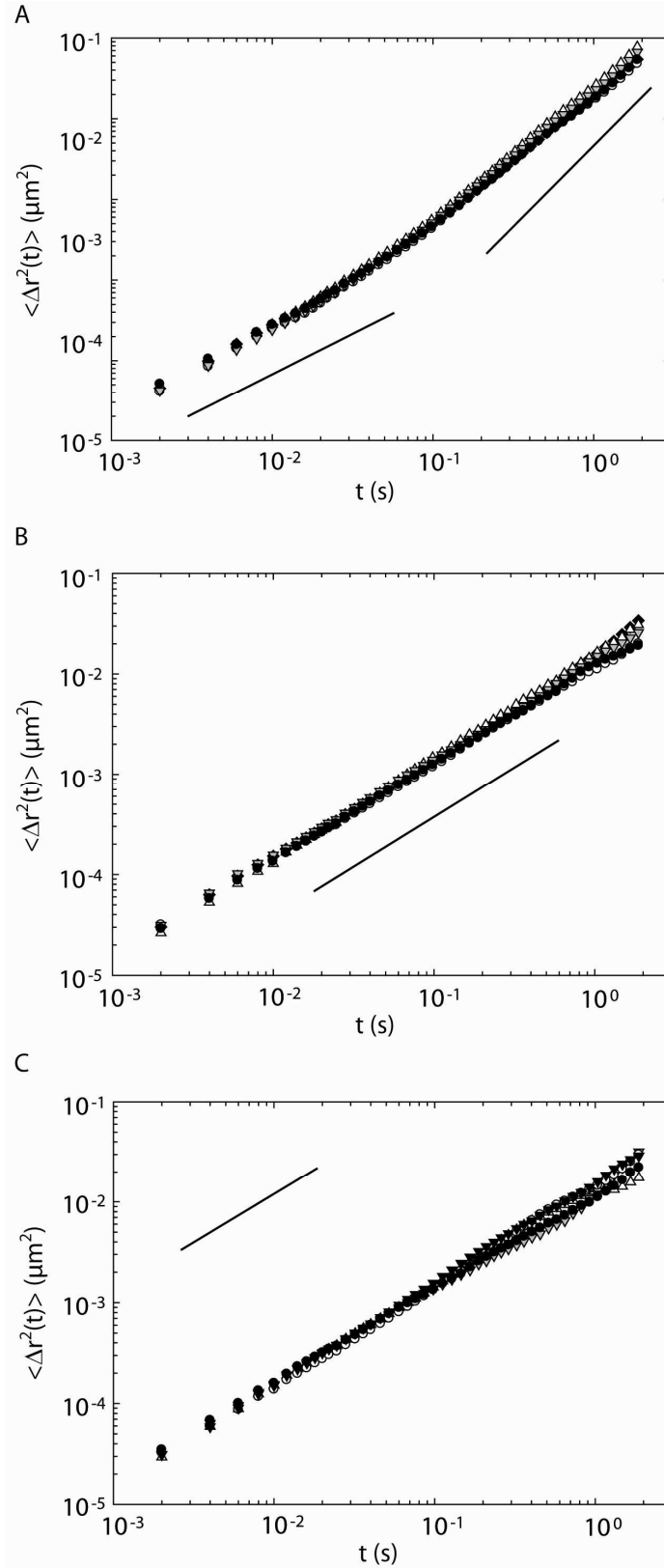
La figure suivante (figure 2.17) montre les déplacements quadratiques moyens de plusieurs microbilles dans une solution de glycérol, ainsi que la moyenne des déplacements quadratiques moyens. Chaque courbe correspond au mouvement d'une bille. La courbe tracée avec les cercles noirs pleins est la courbe moyenne, obtenue en moyennant les déplacements quadratiques moyens des différentes billes. Cette courbe a une pente de 1, ce qui est en accord avec la théorie : le glycérol est un fluide purement visqueux, le mouvement d'une microbille est alors purement diffusif et son déplacement quadratique moyen au cours du temps est linéaire. Comme nous pouvons l'observer, les différents déplacements quadratiques moyens commencent à diverger les uns des autres et de la courbe moyenne à des temps  $t \geq 2 \text{ s}$ . Ainsi,

pour des temps  $t \leq 2$  s, le déplacement quadratique moyen d'une bille permet de rendre compte correctement de la nature du milieu environnant ; mais au-delà, pour des temps  $2 \text{ s} \leq t \leq 8 \text{ s}$ , l'échantillonnage statistique est insuffisant pour obtenir des résultats fiables. Ceci justifie de ne tracer les courbes de déplacements quadratiques moyens que pour des temps  $t \leq 2$  s.



**Figure 2.17** – Déplacement quadratique moyen de différentes billes dans du glycérol en fonction du temps sur 8 s. La courbe tracée avec des cercles noirs pleins est la courbe moyenne. La pente de la droite représentée est de 1.

La figure suivante (figure 2.18) présente les déplacements quadratiques moyens de différentes microbilles (comme précédemment, chaque courbe correspond à une bille) dans du glycérol, avec et sans translation, et avec et sans correction de la translation. La figure du haut (2.18 A) montre les déplacements quadratiques moyens de plusieurs billes obtenus en analysant directement l'enregistrement de leur mouvement, sans extraire le mouvement de translation : à temps courts, la pente des courbes est de 1, ce qui correspond au régime diffusif attendu ; à temps longs, la pente est de 2, ce qui correspond au mouvement de translation. La figure du milieu (2.18 B) montre les déplacements quadratiques moyens de ces billes, obtenus après soustraction du mouvement de translation : la pente des courbes est de 1, comme attendu. La figure du bas (2.18 C) montre les déplacements quadratiques moyens de billes dans la même solution de glycérol, mais sans mouvement de translation. Nous pouvons observer que les déplacements quadratiques de ces billes sont identiques à ceux présentés dans la figure du milieu. Notre technique nous semble donc pertinente pour soustraire le mouvement de translation des billes dû au glissement de l'échantillon.



**Figure 2.18** – Déplacement quadratique moyen de billes dans du glycérol en fonction du temps. En haut (A) : mouvement de translation non corrigé ; pentes des droites de 1 à temps court et 2 à temps long. Au milieu (B) : mouvement de translation corrigé ; pente de la droite de 1. En bas (C) : sans mouvement de translation ; pente de la droite de 1.

### Programme pour en déduire $G'$ et $G''$

Afin de comparer les mesures faites en macrorhéologie et microrhéologie, les modules élastiques et visqueux et leur dépendance en fréquence sont calculés à partir des déplacements quadratiques moyens.

Comme nous l'avons vu au paragraphe 2.4.1.2., la relation de Stokes Einstein généralisée donne la relation entre le module viscoélastique complexe et le déplacement quadratique moyen. Comme ce dernier est bidimensionnel, l'équation 2.40 devient [40,101,103]:

$$\tilde{G}^*(s) = \frac{2k_B T}{3\pi R s \langle \Delta \tilde{r}^2(s) \rangle} \quad 2.52$$

où, rappelons-le,  $k_B$  est la constante de Boltzmann,  $T$  la température,  $R$  le rayon de la microbille,  $s$  la fréquence de Laplace,  $\langle \Delta \tilde{r}^2(s) \rangle$  la transformée de Laplace du déplacement quadratique moyen  $\langle \Delta r^2(t) \rangle$ , et  $\tilde{G}^*(s)$  la transformée de Laplace du module viscoélastique complexe  $G^*(\omega)$ . Rappelons que  $G^* = G'(\omega) + iG''(\omega)$ , où  $G'$  est le module élastique, et  $G''$  le module visqueux.

Le module viscoélastique complexe peut être déduit simplement du mouvement des billes si le déplacement quadratique moyen  $\langle \Delta r^2(t) \rangle$  des microbilles peut être décrit localement par une loi de puissance [101]. Cette méthode est valide pour des courbes de  $\langle \Delta r^2(t) \rangle$  ne présentant pas de variations brusques. Son avantage est d'éviter d'avoir à calculer des transformées de Laplace, calcul qui peut être source d'erreurs. En effet, le déplacement quadratique moyen n'est connu que sur une gamme de temps limitée, et la transformation de Laplace requiert une intégration temporelle de  $t = 0$  à  $t \rightarrow \infty$ . La transformation numérique des données est faite sur un temps limité, ce qui induit des erreurs de troncature. Par ailleurs, l'analyse requiert souvent l'utilisation d'une fonction arbitraire pour faire un ajustement de  $\tilde{G}^*(s)$  [40,101].

Le comportement en loi de puissance est déterminé à partir de la dérivée temporelle du déplacement quadratique moyen en échelle logarithmique. La pente du déplacement quadratique moyen en fonction de temps tracé en échelle logarithmique est comprise entre 0 et 1, pour des microbilles passivement mues par l'agitation thermique (fin du paragraphe 2.4.1.2.). Une pente de 0, donc un déplacement quadratique moyen constant avec le temps, correspond à un confinement dans un milieu purement élastique. Une pente de 1, donc un déplacement quadratique moyen linéaire avec le temps, correspond à un mouvement de diffusion dans un milieu purement visqueux. Si l'on décrit localement, donc pour chaque temps  $t$  (correspondant à une pulsation  $\omega = 1/t$ ), le déplacement quadratique moyen par une loi de puissance, les modules élastiques  $G'(\omega)$  et visqueux  $G''(\omega)$  peuvent être calculés analytiquement. En effet, si le déplacement quadratique moyen peut être décrit localement par une loi de puissance, il s'écrit au voisinage de  $t = 1/\omega$  :

$$\langle \Delta r^2(t) \rangle = \langle \Delta r^2(1/\omega) \rangle \omega^{\alpha(\omega)} t^{\alpha(\omega)} \quad 2.53$$

La transformée de Laplace du déplacement quadratique moyen  $\langle \Delta \tilde{r}^2(s) \rangle$  s'écrit alors :

$$\langle \Delta \tilde{r}^2(s) \rangle = \langle \Delta r^2(1/\omega) \rangle \omega^{\alpha(\omega)} s^{-[\alpha(\omega)+1]} \Gamma[1 + \alpha(\omega)] \quad 2.54$$

L'équation 2.52 conduit alors à :

$$\tilde{G}^*(s) = \frac{2k_B T s^{\alpha(\omega)}}{3\pi R \omega^{\alpha(\omega)} \langle \Delta r^2(1/\omega) \rangle \Gamma[1 + \alpha(\omega)]} \quad 2.55$$

Par conséquent :

$$G^*(\omega) = \frac{2k_B T}{3\pi R \langle \Delta r^2(1/\omega) \rangle \Gamma[1 + \alpha(\omega)]} e^{i\pi\alpha(\omega)/2} \quad 2.56$$

Les modules élastiques  $G'(\omega)$  et visqueux  $G''(\omega)$  sont alors les suivants :

$$G'(\omega) = |G^*(\omega)| \cos \frac{\pi\alpha(\omega)}{2} \quad 2.57$$

et

$$G''(\omega) = |G^*(\omega)| \sin \frac{\pi\alpha(\omega)}{2} \quad 2.58$$

Avec

$$|G^*(\omega)| = \frac{2k_B T}{3\pi R \langle \Delta r^2(1/\omega) \rangle \Gamma[1 + \alpha(\omega)]} \quad 2.59$$

où  $\langle \Delta r^2(1/\omega) \rangle$  est la valeur de  $\langle \Delta r^2(t) \rangle$  à  $t = 1/\omega$  ;  $\Gamma$  désigne la fonction gamma ;  $\alpha(\omega)$  est l'exposant de la loi de puissance locale, évalué à partir de la dérivée temporelle du déplacement quadratique moyen :  $\alpha(\omega) = \left. \frac{\partial \ln [\langle \Delta r^2(t) \rangle]}{\partial \ln [t]} \right|_{t=1/\omega}$ .

#### 2.4.2.4. Résolution spatiale du montage expérimental

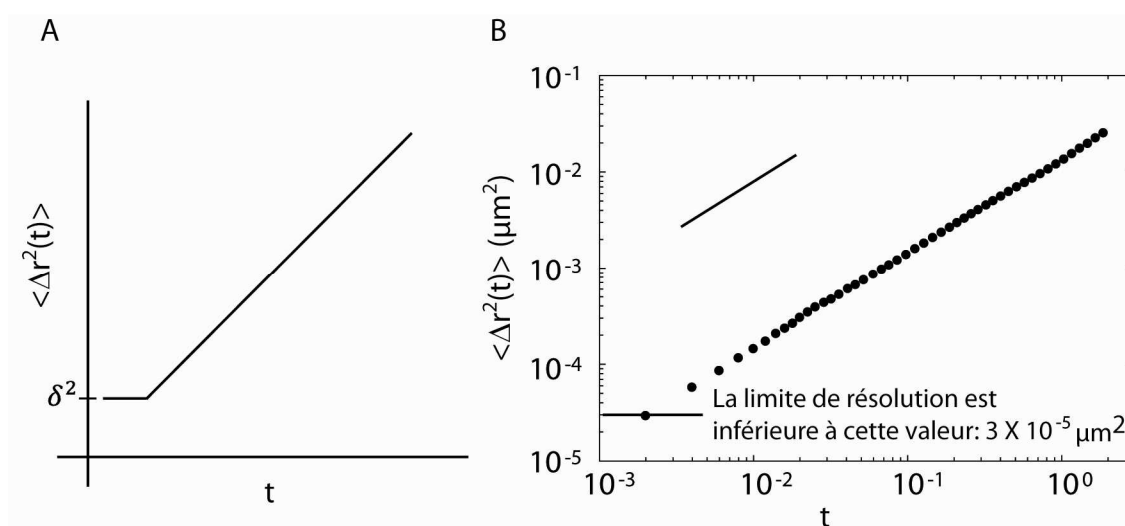
Après avoir présenté les techniques d'injection, d'observation, et d'analyse mises au point pour réaliser les expériences de microrhéologie dans les méduses, nous donnons la limite de résolution spatiale de notre système expérimental.

Nous avons déterminé la limite de résolution spatiale de notre montage expérimental (microscope, caméra, logiciel d'analyse) par des expériences de microrhéologie dans des

solutions de glycérol. Ces expériences ont été réalisées dans les mêmes conditions que les mesures effectuées dans la mésoglée des méduses (procédures et conditions de visualisation des billes et d'analyse des résultats identiques).

La visualisation du mouvement des microbilles dans les solutions de glycérol et le tracé de leur déplacement quadratique moyen nous permet de déterminer la limite spatiale de résolution de nos expériences. Le glycérol est un liquide purement visqueux, et de viscosité connue. Cette grande viscosité est associée à un faible coefficient de diffusion : l'amplitude du mouvement brownien des billes est limitée et leur déplacement quadratique moyen est faible, particulièrement pour les temps courts. Le tracé théorique du déplacement quadratique moyen d'une bille dans du glycérol en coordonnées logarithmiques est normalement une droite de pente 1. Notons  $\delta$  la limite de résolution du système (microscope, caméra, logiciel d'analyse...). Des valeurs du déplacement quadratique moyen  $\langle \Delta r^2(t) \rangle < \delta^2$  ne peuvent être détectées correctement, et par conséquent ces valeurs sont mesurées comme constantes au cours du temps, égales à  $\delta^2$  (figure 2.19 A). Nous avons mesuré dans le glycérol un déplacement quadratique moyen en fonction du temps parfaitement linéaire. Cela signifie que la valeur de la limite de résolution spatiale de notre montage,  $\delta$ , est au plus égale à la racine carrée du plus petit déplacement quadratique moyen mesuré ( $3 \times 10^{-5} \mu\text{m}^2$ ), qui est d'environ 5 nm. Ainsi, les courbes de déplacements quadratiques moyens dont les valeurs sont supérieures à  $3 \times 10^{-5} \mu\text{m}^2$  sont fiables, et celles dont les valeurs sont inférieures à  $3 \times 10^{-5} \mu\text{m}^2$  sont à écarter.

La figure 2.19 B montre une courbe typique de déplacement quadratique moyen d'une bille dans le glycérol, et indique la valeur du plus petit déplacement quadratique moyen mesuré.



**Figure 2.19** – Déplacement quadratique moyen de billes dans du glycérol en fonction du temps.   gauche (A) : schéma du déplacement quadratique moyen en fonction du temps quand la limite de résolution est de  $\delta$ .   droite (B) : déplacement quadratique moyen en fonction du temps dans du glycérol. La pente de la droite représentée est de 1.

Après avoir exposé en détail le protocole développé pour réaliser les expériences de microrhéologie, présentons à présent les résultats de ces expériences dans la mésoglée des méduses juvéniles et des méduses adultes.

### 2.4.3. Résultats

Comme nous l'avons mentionné en introduction (paragraphe 2.1.3.), afin de pouvoir décrire et approfondir le processus de vieillissement de la mésoglée, nous avons effectué les expériences de microrhéologie dans la matrice extracellulaire de 30 méduses juvéniles et 6 méduses adultes. Les microbilles ont systématiquement été injectées loin des feuilletts cellulaires, dans la région de la mésoglée caractérisée par la présence des fibres larges verticales.

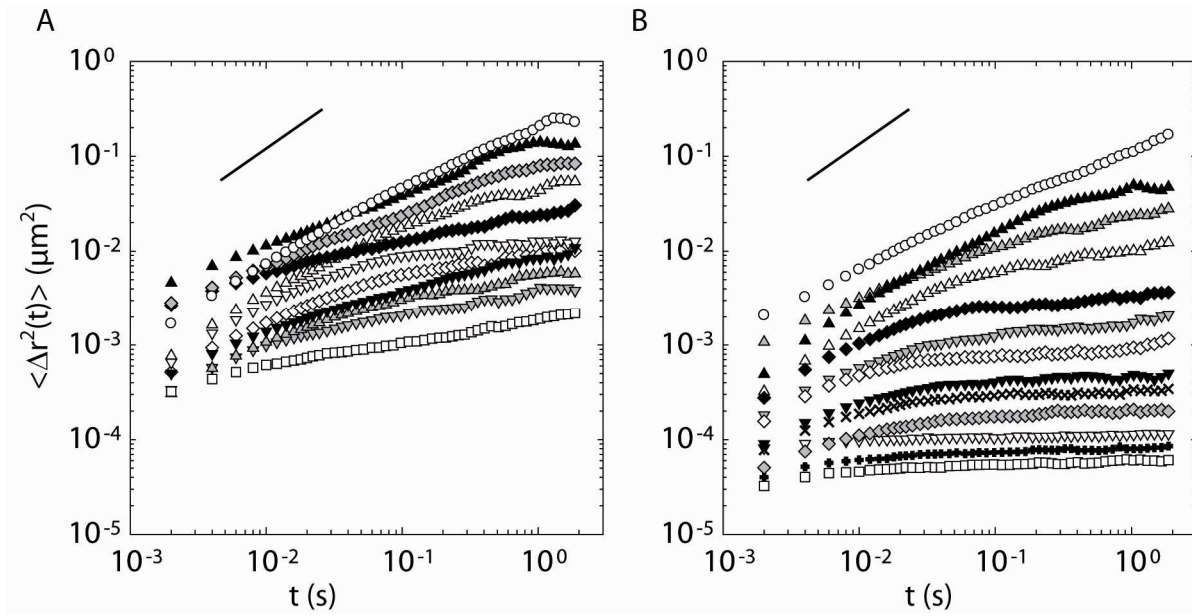
Nous présenterons tout d'abord les résultats obtenus dans les méduses juvéniles, puis ceux obtenus dans les méduses adultes, et nous les comparerons. Puis nous comparerons les résultats de macro- et de microrhéologie obtenus dans les méduses adultes.

#### 2.4.3.1. Méduses juvéniles

La figure 2.20 A montre les résultats d'une expérience typique de microrhéologie dans la mésoglée d'une méduse juvénile. Sont représentés les déplacements quadratiques moyens  $\langle \Delta r^2(t) \rangle$  en fonction du temps de 11 microbilles. Ces billes ont été injectées ensemble dans la matrice extracellulaire, puis ont été visualisées un jour après l'injection. Les déplacements quadratiques moyens sont représentés en échelle logarithmique. Les pentes locales de toutes les courbes sont inférieures à 1 : les billes ont un mouvement sous-diffusif (une pente de 1 correspond à un mouvement purement diffusif). Cela signifie que la matrice extracellulaire est un milieu viscoélastique [40], ce qui est en accord avec les mesures de macrorhéologie. Cependant, le résultat le plus notable est la diversité des comportements des microbilles. Nous avons pu observer qu'elles ont des mouvements brownien très variés : certaines ont un mouvement beaucoup plus libre que d'autres, ce qui conduit à la diversité des courbes de déplacements quadratiques moyens visible sur la figure 2.20 A ; les déplacements quadratiques moyens les plus importants correspondent aux billes les plus mobiles. Ces variations locales des comportements des microbilles révèlent l'hétérogénéité mécanique de la matrice extracellulaire à l'échelle du micron. Cette hétérogénéité spatiale est cohérente avec les observations de microscopie électronique à balayage, qui révélaient d'importantes hétérogénéités de l'organisation fibreuse à l'échelle microscopique (voir le paragraphe 2.2.2.2.).



#### 2.4.3.2. Méduses adultes



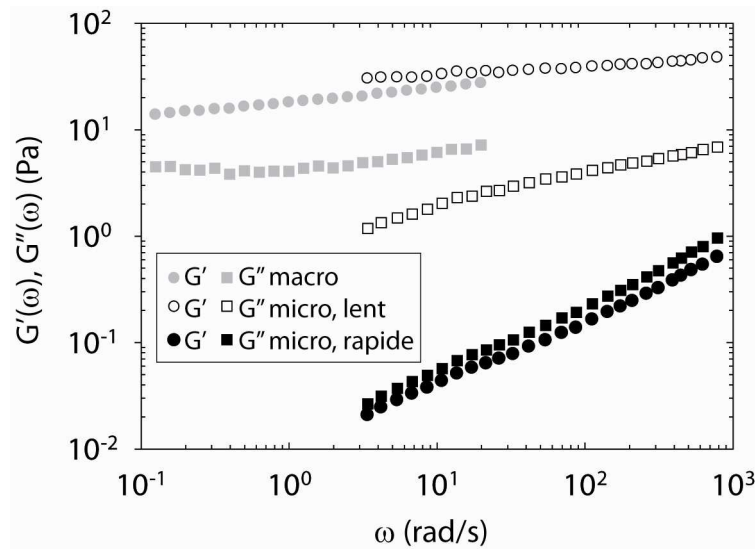
**Figure 2.20** – Déplacement quadratique moyen de billes en fonction du temps dans la mésoglée de méduses. Les pentes des droites représentées sont de 1. À gauche (A) : résultat typique d’une expérience de microrhéologie dans une méduse juvénile. À droite (B) : résultat typique d’une expérience de microrhéologie dans une méduse adulte.

La figure 2.20 B montre les résultats d’une expérience typique de microrhéologie dans la mésoglée d’une méduse adulte. Sont représentés les déplacements quadratiques moyens  $\langle \Delta r^2(t) \rangle$  en fonction du temps de 13 microbilles. Comme nous l’avons observé dans la mésoglée des méduses juvéniles, les microbilles ont un mouvement sous-diffusif, ce qui montre que la matrice extracellulaire est un milieu viscoélastique. Nous pouvons également noter une grande diversité des courbes de déplacement quadratique moyen. Cependant, la dispersion de ces courbes est plus importante dans la mésoglée des méduses adultes que dans celle des méduses juvéniles. Notamment, certaines microbilles ont un mouvement brownien de très faible amplitude, et leur déplacement quadratique moyen est très faible ( $<10^{-4} \mu\text{m}^2$ ) et quasiment constant au cours du temps. Nous avons vérifié qu’il était supérieur à la limite de résolution du système. Ces billes sont étroitement piégées dans le réseau fibreux de la matrice, et leur déplacement quadratique moyen montre qu’elles sont insérées localement dans un milieu quasiment purement élastique. Les autres billes ont un mouvement brownien plus libre et leurs déplacements quadratiques moyens sont proches de ceux mesurés dans les méduses juvéniles.

#### 2.4.3.3. Modules viscoélastiques aux échelles macroscopiques et microscopiques

Nous avons réalisé des expériences de macro- et de microrhéologie dans la mésogée de méduses adultes. Afin de comparer les mesures de rhéologie réalisées aux différentes échelles, nous avons déterminé les modules élastiques ( $G'(\omega)$ ) et visqueux ( $G''(\omega)$ ) locaux à partir des mesures de déplacements quadratiques moyens des expériences de microrhéologie (voir équations 2.57, 2.58 et 2.59 à la fin du paragraphe 2.4.2.3.). L'équation 2.59 a été établie pour un milieu homogène, et  $\langle \Delta r^2(1/\omega) \rangle$  doit être estimé par une moyenne temporelle et une moyenne d'ensemble sur plusieurs billes à  $t = 1/\omega$ . Cependant, la matrice extracellulaire de la méduse est un milieu très hétérogène, comme le montre la diversité des courbes de déplacement quadratique moyen (figure 2.20). Cette dispersion des courbes correspond à une hétérogénéité mécanique de la matrice extracellulaire, et donc des modules viscoélastiques locaux [148]. Par conséquent,  $\langle \Delta r^2(1/\omega) \rangle$  est évalué pour chaque bille indépendamment, et la moyenne est alors uniquement temporelle [148]. De plus, afin que la moyenne temporelle puisse être statistiquement correcte, comme nous l'avons expliqué au paragraphe 2.4.2.3., nous restreignons notre analyse aux temps  $t < 2$  s, donc aux pulsations  $\omega > 3.14$  rad/s.

La figure 2.21 montre les modules élastiques et visqueux moyens obtenus à l'échelle macroscopique au moyen du rhéomètre (paragraphe 2.3.3.), et les compare à des modules locaux obtenus par les expériences de microrhéologie. Ils ont été déterminés à partir du déplacement quadratique moyen de deux microbilles aux comportements très différents : une première bille dont le mouvement brownien est très confiné, et une seconde dont le mouvement est beaucoup plus libre. Sur la figure 2.20 B, la courbe de déplacement quadratique moyen correspondant à la bille qui bouge peu (mouvement lent) est tracée avec des carrés, et présente les valeurs de déplacements quadratiques moyens les plus basses. La courbe de déplacement quadratique moyen correspondant à la bille qui bouge beaucoup (mouvement rapide) est tracée avec des cercles, et donne les valeurs de déplacements quadratiques moyens les plus élevées. Les ordres de grandeur des modules élastiques et visqueux mesurés avec le rhéomètre sont voisins des ceux calculés à partir du mouvement de la microbille étroitement confinée dans le réseau fibreux de la matrice. Par contre, la bille bougeant plus librement explore un microenvironnement beaucoup plus mou, aux modules viscoélastiques locaux plus faibles (figure 2.21). Ainsi, la mésogée apparaît comme beaucoup plus rigide à l'échelle macroscopique que ne le sont nombre de microenvironnements de sa structure fibreuse.



**Figure 2.21** – Modules élastiques  $G'$  (cercles) et visqueux  $G''$  (carrés) en fonction de la pulsation aux échelles macroscopiques et microscopiques. En gris : modules viscoélastiques à l'échelle macroscopique, mesurés par un rhéomètre. En noir : modules viscoélastiques à l'échelle microscopique mesurés à partir du mouvement d'une bille qui bouge beaucoup. En blanc : modules viscoélastiques à l'échelle microscopique mesurés à partir du mouvement d'une bille qui bouge peu.

#### 2.4.4. Limites de la technique et contrôles réalisés

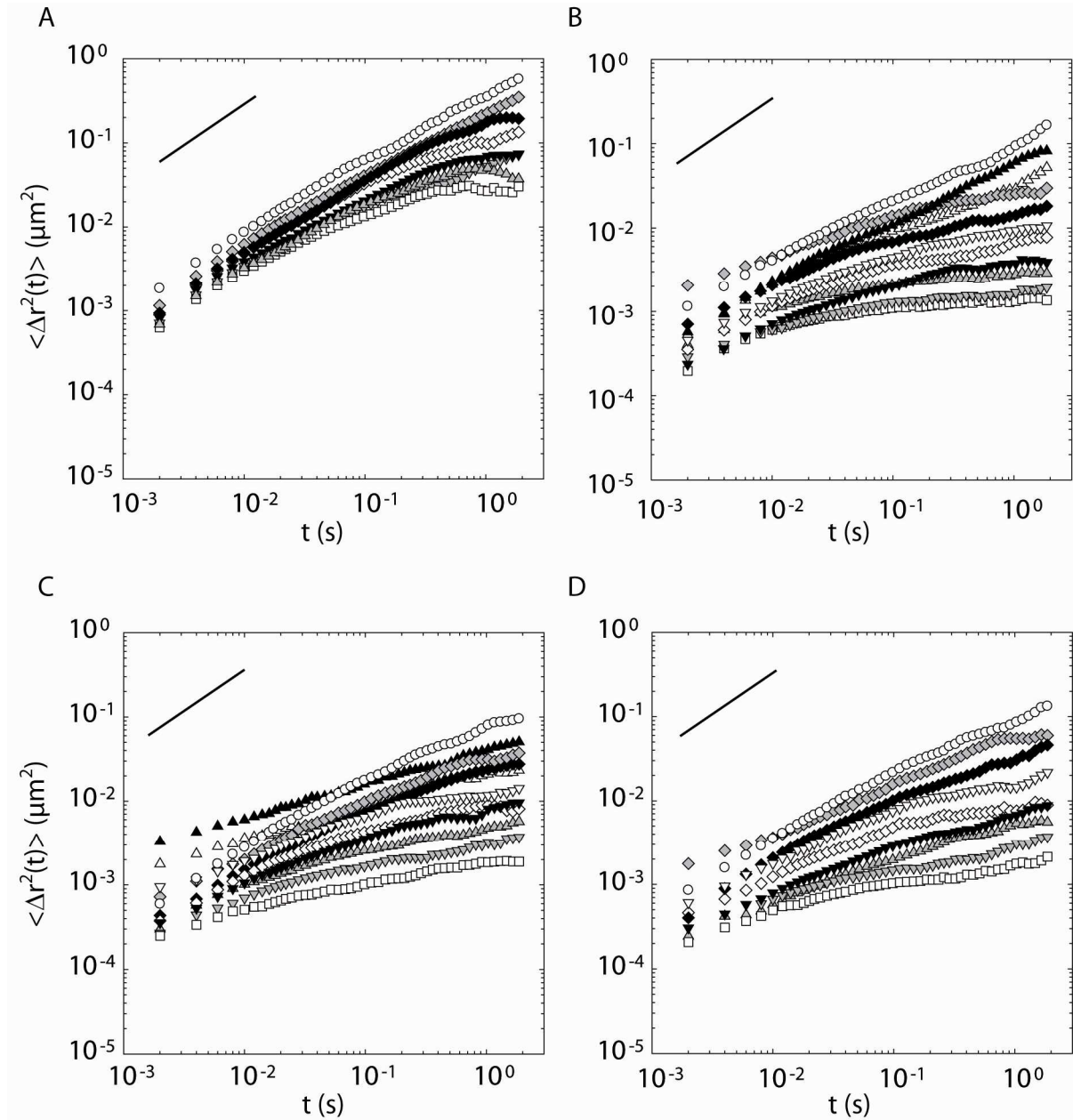
Nous présenterons tout d'abord la limite principale de la technique de microrhéologie, liée à son caractère invasif, et les expériences réalisées montrant que, malgré cet inconvénient, cette technique peut être utilisée dans notre cas.

Par ailleurs, nous avons vérifié, par des expériences de contrôle, que la nature (groupements chimiques de surfaces) des microbilles n'affectait pas les résultats, afin d'exclure que d'éventuelles interactions chimiques entre les billes et la matrice aient pu affecter les résultats. Enfin, nous avons vérifié que les différences des protocoles employés pour réaliser les expériences de microhéologie dans les méduses juvéniles et les méduses adultes n'étaient pas responsables des différences de résultats obtenues.

##### 2.4.4.1. Limite de la technique de microrhéologie

Nous avons mesuré les propriétés mécaniques de la mésoglée à l'échelle du micron en injectant des microbilles dans la matrice extracellulaire de la méduse et en suivant leur mouvement brownien. L'inconvénient de cette technique est que l'injection des billes est un

processus invasif et pourrait endommager localement le réseau fibreux. Aussi, le mouvement brownien des microbilles a été visualisé un jour après injection. Nous avons en effet mesuré que le mouvement brownien des billes était plus confiné un jour après, que juste après l'injection. De plus, les résultats de microrhéologie obtenus un jour, ou plusieurs jours après l'injection, étaient similaires.



**Figure 2.22** – Déplacement quadratique moyen de billes en fonction du temps dans la mésoglée d'une méduse mesurés à intervalles réguliers après injection. Les pentes des droites représentées sont de 1. En haut à gauche (A) : résultat juste après injection. En haut à droite (B) : résultat un jour après injection. En bas à gauche (C) : résultat deux jours après injection. En bas à droite (D) : résultat trois jours après injection.

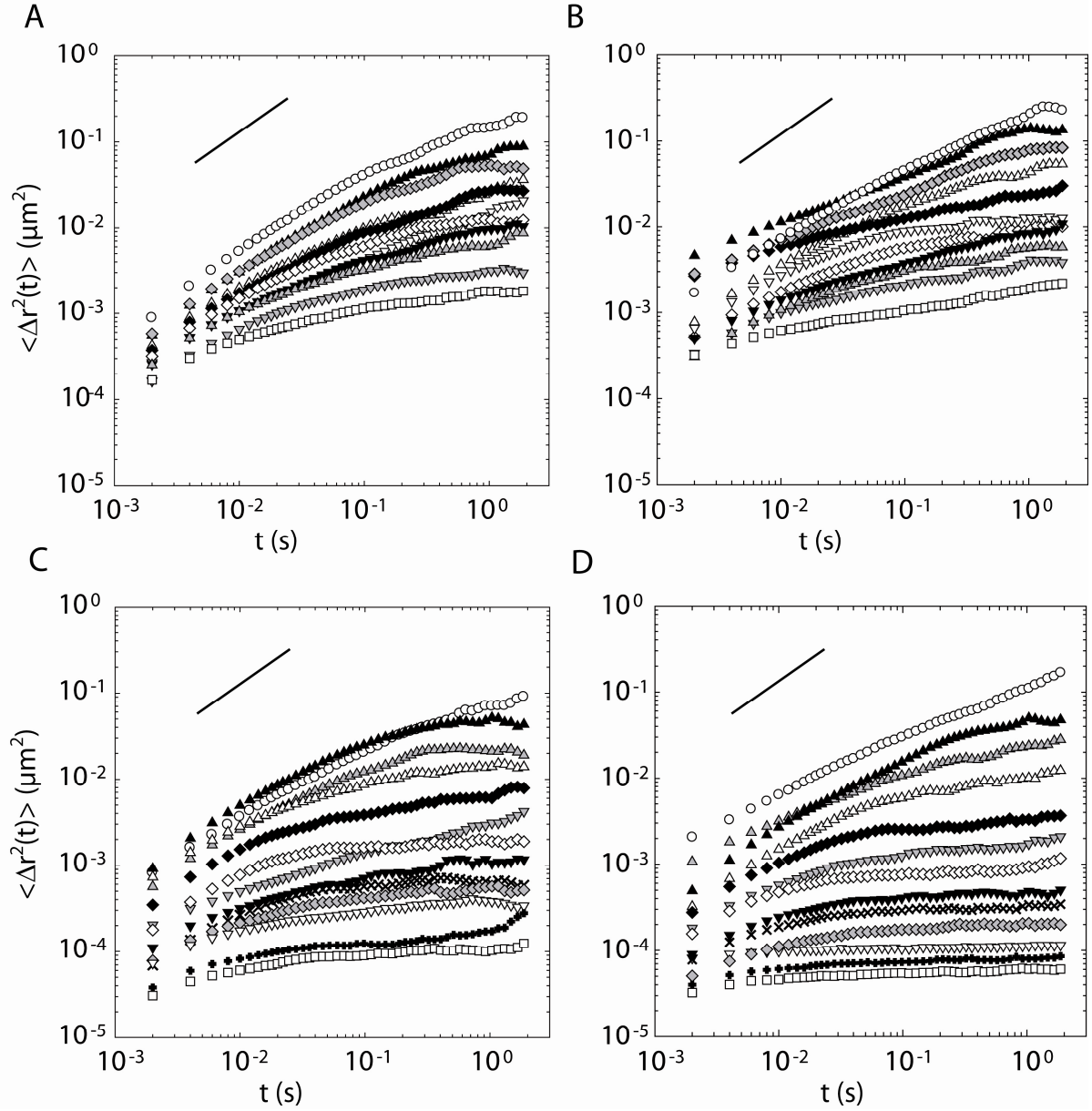
La figure 2.22 montre des résultats de microrhéologie obtenus dans une méduse juvénile à différents instants : juste après l'injection, 1 jour, 2 jours, et 3 jours après l'injection. Chaque courbe correspond au mouvement d'une microbille. Nous pouvons observer que les valeurs de déplacements quadratiques moyens sont plus élevées juste après l'injection qu'un ou plusieurs jours après. Ce résultat correspond au fait que le mouvement des microbilles est beaucoup plus important juste après l'injection : les billes sont alors plus libres, car elles sont immergées dans une matrice localement gonflée d'eau par l'injection, et elles ne sont pas encore bien insérées dans le réseau fibreux, qui limiterait leur mouvement. Par contre, les résultats un ou plusieurs jours après injection sont identiques. Les billes sont alors bien insérées dans la matrice extracellulaire.

Ainsi, malgré le caractère invasif de l'injection, les billes peuvent s'insérer progressivement dans la matrice. L'eau de mer injectée avec les billes diffuse progressivement, la matrice retrouve localement son état antérieur, et les microbilles s'insèrent dans le réseau fibreux. Ce processus est achevé un jour après l'injection. L'avantage de cette technique est que les microbilles, introduites au sein de la matrice, sont en contact direct avec elle. Ses propriétés mécaniques peuvent être mesurées directement et localement.

#### ***2.4.4.2. Expériences de microrhéologie avec des billes de polystyrène***

La chimie de surface des microbilles peut affecter les résultats de microrhéologie. Les microbilles employées dans nos expériences étaient des billes fluorescentes d'1  $\mu\text{m}$  de diamètre, avec un groupement de surface amine. Leur fluorescence nous permettait de retrouver aisément le lieu d'injection des billes, afin de réaliser les observations un jour après injection.

Nous avons vérifié que la chimie de surface des microbilles n'affectait pas nos résultats de microrhéologie. Nous avons répété nos mesures de microrhéologie avec des billes de polystyrène, non fluorescentes, de 1  $\mu\text{m}$  de diamètre (Thermo Fisher Scientific, réf 4009A). Nous les avons injectées et visualisées dans la mésoglée de 5 méduses adultes et 5 méduses juvéniles, en employant le même protocole que celui utilisé pour les billes fluorescentes au groupement amine. La figure suivante (figure 2.23) montre que les résultats de microrhéologie sont similaires en employant les microbilles fluorescentes au groupement amine ou les billes de polystyrène, et ce, à la fois dans la mésoglée des méduses juvéniles et dans celle des méduses adultes. Il apparaît donc que les différences observées dans les expériences de microrhéologie entre méduses juvéniles et méduses adultes ne sont pas dues à d'éventuelles interactions entre les fibres et les groupements de surface des billes, mais révèlent un durcissement des microenvironnements du réseau fibreux de la méduse adulte.

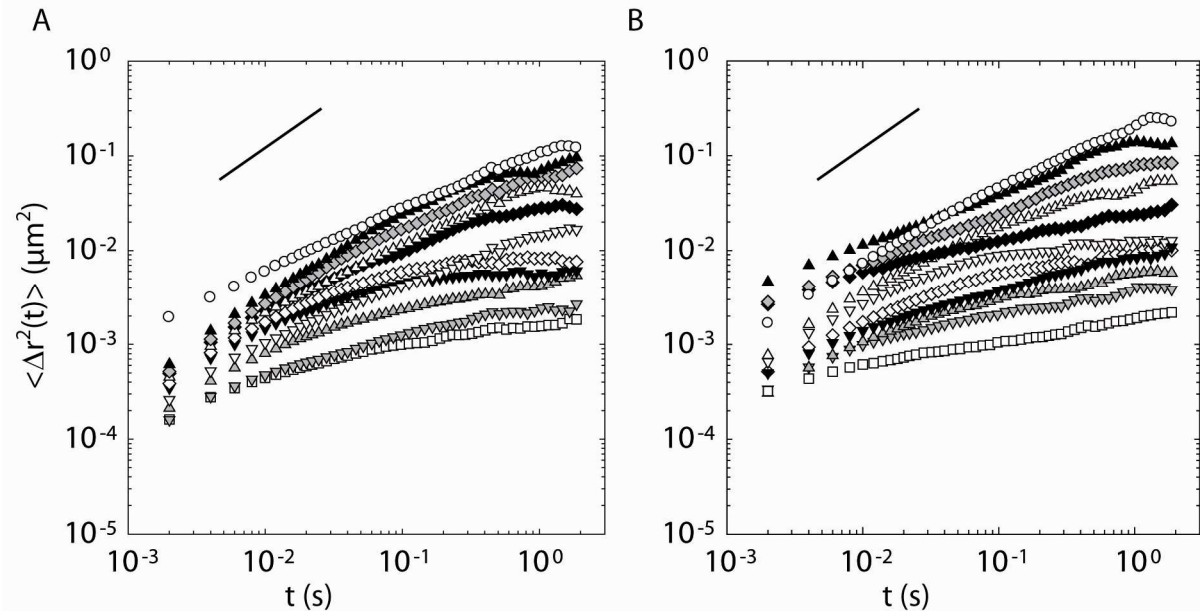


**Figure 2.23** – Expériences de contrôle de microrhéologie avec des billes de  $1\ \mu\text{m}$  avec différents groupes de surface. Déplacement quadratique moyen des billes en fonction du temps dans la mésoglye de méduses juvéniles et de méduses adultes. Les pentes des droites représentées sont de 1. En haut à gauche (A) : résultat avec les billes de polystyrène dans une méduse juvénile. En haut à droite (B) : résultat avec les billes fluorescentes au groupement amine dans une méduse juvénile. En bas à gauche (C) : résultat avec les billes de polystyrène dans une méduse adulte. En bas à droite (D) : résultat avec les billes fluorescentes au groupement amine dans une méduse adulte.

#### 2.4.4.3. Expériences de microrhéologie dans des morceaux de méduses juvéniles

Les expériences de microrhéologie réalisées sur les méduses juvéniles ont été réalisées *in vivo*, sur des méduses paralysées, afin d'être aussi peu invasif que possible. Par contre, les expériences sur les méduses adultes ont été réalisées sur des morceaux de mésoglée, car les méduses adultes sont trop grandes, et il n'est alors pas possible de réaliser les expériences *in vivo*.

Les différences observées dans les résultats de microrhéologie pourraient être une conséquence de ces différences de conditions expérimentales. En particulier, les tranches de mésoglée de méduses adultes ont été conservées pendant un jour au réfrigérateur, et les billes n'ont donc pas été exposées à un environnement dynamique. Par contre, les billes injectées dans des méduses juvéniles ont été placées dans un environnement dynamique, subissant d'importantes contraintes mécaniques lors des contractions. Ces contraintes périodiques ont pu modifier la distribution finale des billes dans le réseau fibreux de la mésoglée des méduses juvéniles, et modifier les résultats de microrhéologie. Afin de s'affranchir d'un éventuel biais dans la distribution des billes, les expériences de microrhéologie ont été répétées dans les méduses juvéniles dans les mêmes conditions que pour les méduses adultes. Ainsi, des morceaux de mésoglée ont été découpés dans 5 méduses juvéniles, dans la région traversée par les fibres larges verticales, et les microbilles fluorescentes ont été injectées dans ces échantillons. Ils ont été ensuite conservés une journée au réfrigérateur, puis le mouvement brownien des microbilles a été visualisé le jour suivant l'injection. Ainsi, le protocole expérimental était identique pour les méduses juvéniles et les méduses adultes.



**Figure 2.24** – Expériences de contrôle de microrhéologie. Déplacement quadratique moyen de billes en fonction du temps dans la mésoglée de méduses juvéniles. Les pentes des droites représentées sont de 1. À gauche (A) : résultat avec des billes injectées et visualisées dans un morceau de mésoglée. À droite (B) : résultat avec des billes injectées et visualisées *in vivo*.



Les observations de microscopie ont révélé que l'environnement dynamique des billes injectées dans la mésoglée des méduses juvéniles ne semblait pas avoir modifié la répartition des billes dans la matrice extracellulaire. Par ailleurs, comme le montre la figure 2.24, les résultats de microrhéologie étaient identiques dans les méduses juvéniles observées *in vivo* et dans les morceaux de mésoglée de méduses juvéniles.

Ainsi, les différences de caractéristiques mécaniques locales des microenvironnements de la matrice extracellulaire des méduses juvéniles et des méduses adultes ne semblent pas provenir d'artéfacts dues aux différences de conditions expérimentales. Elles seront interprétées comme étant le résultat d'une progressive agrégation des fibres de la matrice accompagnant le vieillissement de la mésoglée (cela sera discuté au paragraphe 2.5.3.).

Après avoir présenté les résultats de notre étude de la structure et des propriétés mécaniques de la mésoglée, aux échelles macroscopiques et microscopiques, nous souhaitons mettre en relation ces mesures les unes avec les autres, et les interpréter.

#### **2.4.5. Résumé des résultats**

Rappelons tout d'abord brièvement les résultats de notre étude. Nous avons mesuré les propriétés mécaniques de la mésoglée à différentes échelles, et avons trouvé que la mésoglée se comporte comme un gel viscoélastique à l'échelle macroscopique, et comme un matériau viscoélastique beaucoup plus mou et hétérogène à l'échelle microscopique. Par ailleurs, des visualisations de l'architecture fibreuse par microscopie à contraste interférentiel et microscopie électronique à balayage ont montré que des fibres larges dont l'architecture est organisée traversent la mésoglée, et qu'elles sont entourées par un réseau de fibres fines distribuées de manière hétérogène et aléatoire. Enfin, nous avons mesuré l'évolution des propriétés rhéologiques de la matrice à l'échelle du micron, à différents stades de développement de la méduse, et nous avons mesuré que de nombreux microenvironnements de la matrice extracellulaire de la méduse adulte étaient plus rigides que ceux de la méduse juvénile.

### **2.5. Interprétation des résultats**

Nous mettrons tout d'abord en relation les propriétés mécaniques de la mésoglée avec sa structure. Puis, nous exposerons le lien entre ces propriétés mécaniques et la nage de la méduse. Ensuite, nous montrerons que nos résultats permettent de mieux comprendre comment la mésoglée vieillit. Enfin, nous présenterons, à la lumière de ces résultats, quel rôle semble jouer la mésoglée dans la croissance des canaux du système gastrovasculaire de la méduse.

### 2.5.1. Interprétations des propriétés mécaniques de la mésoglée en lien avec sa structure

Nous montrerons tout d'abord que la structure fibreuse de la mésoglée rend ses propriétés mécaniques très proches de celles d'un gel de collagène. Puis, nous présenterons le lien entre son architecture fibreuse et les différences de propriétés mécaniques observées aux échelles macroscopiques et microscopiques.

#### 2.5.1.1. La mésoglée et les gels de collagène

La mésoglée d'*Aurelia aurita* est un système fibreux partiellement composé de fibres de collagène [20,26,27,133,144]. Les fibres de collagènes présentes dans les cnidaires sont proches de différents types de fibres de collagène présents chez les vertébrés. Ainsi, Miura et Kimura [109] trouvèrent des fibres voisines chimiquement du collagène de Type V dans la méduse *Stomolophus nomuria*. Des analogues au collagène de type I, II, et III ont été trouvés dans différentes espèces d'hydres [46,144]. À notre connaissance, la structure chimique des fibres de collagène d'*Aurelia aurita* n'a pas été étudiée.

Nos mesures de macrorhéologie dans la matrice d'*Aurelia aurita* sont similaires à celles obtenues dans des gels de collagène reconstitués de Type I [67,76,83,155]. Même si les valeurs précises des modules viscoélastiques dépendent de la concentration du gel de collagène [76], les auteurs mesurèrent dans des gels de collagène des ordres de grandeurs de  $G'$  et  $G''$  proches de nos valeurs. Ils trouvèrent, comme nous, un module élastique ( $G'$ ) supérieur au module visqueux ( $G''$ ), et légèrement croissant avec la fréquence. Par ailleurs, ils trouvèrent une loi de puissance décrivant le comportement des modules viscoélastiques similaire à la nôtre. Nous avons en effet mesuré qu'entre 1 et 20 rad/s,  $G'$  et  $G''$  croissaient avec la fréquence en suivant une loi de puissance d'exposant 0.16. Cet exposant est très proche des exposants de loi de puissance mesurés dans des gels de collagène reconstitués de Type I, dans la même gamme de fréquence : Knapp et al. [83] mesurèrent un exposant de 0.13, et Velegol et Lanni [155] de 0.15.

Velegol et Lanni [155], et Parekh et Velegol [117] ont également déterminé le module élastique de gels de collagène de Type I à l'échelle microscopique par des techniques de piégeage laser. Ils mesurèrent d'importantes variations des modules élastiques d'un endroit à l'autre, traduisant des hétérogénéités de  $G'$  de deux ordres de grandeur à l'échelle du micron. Nous avons également mesuré une importante dispersion des propriétés mécaniques de la mésoglée à l'échelle microscopique (figure 2.21).

Le système fibreux de la mésoglée de la méduse n'est cependant pas exclusivement composé de fibres de collagène, mais contient également d'autres protéines, telles que la fibrilline, qui forme des fibres élastiques [106]. Hsu et al. [67] mesurèrent les propriétés viscoélastiques de gels de collagène dans lesquels 10% de protéines élastiques (élastine) ont été ajoutés. À 25°C,

ils n'ont pas trouvé de différence rhéologique entre les gels de collagène pur et les gels contenant également de l'élastine.

Ainsi, d'un point de vue rhéologique, la mésoglée est très similaire à un simple gel de collagène.

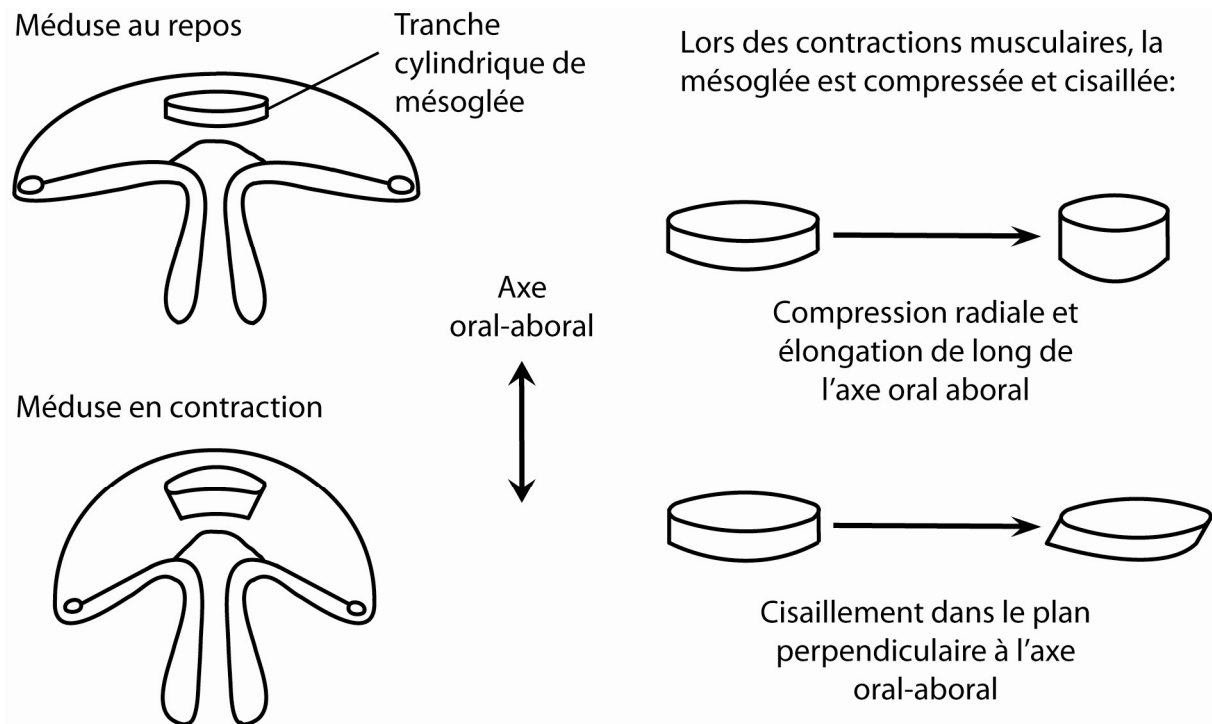
#### **2.5.1.2. La mésoglée aux échelles macroscopiques et microscopiques**

Les propriétés mécaniques de la mésoglée sont liées à son architecture fibreuse, aux échelles macroscopiques comme microscopiques.

Nous avons vu que le réseau fibreux de la mésoglée d'*Aurelia aurita* est traversé par des fibres larges verticales entourées d'un réseau tridimensionnel de fibres fines (paragraphe 2.2.1.3. et 2.2.2.2.). Weber et Schmid [160] ont décrit la matrice comme pouvant être vue mécaniquement comme un matelas moussieux flexible renforcé par des poutres verticales. Les expériences de microrhéologie ont mesuré principalement les propriétés mécaniques du réseau de fibres fines, tandis que les expériences de macrorhéologie ont mesuré les propriétés viscoélastiques de la mésoglée dans son ensemble, donc en incluant les fibres larges. Ces expériences ont montré que la mésoglée se comporte comme un gel viscoélastique à l'échelle macroscopique, et comme un matériau viscoélastique beaucoup plus mou et hétérogène à l'échelle microscopique. Ainsi, comme le réseau des fibres fines est très mou et hétérogène, la rigidité de la mésoglée à l'échelle macroscopique est sans doute assurée par l'architecture des fibres larges qui structure la mésoglée.

#### **2.5.2. Nage de la méduse, et propriétés mécaniques de la mésoglée**

En sus du maintien et du renforcement mécanique de la mésoglée, les fibres larges de la matrice extracellulaire jouent un rôle important dans la nage de la méduse. *Aurelia aurita* nage par propulsion en éjectant de l'eau de mer à chaque contraction musculaire [38]. Les muscles, de disposition annulaire, situés dans l'épiderme de la sous-ombrelle, essentiellement à la périphérie de l'ombrelle, compriment et cisailent la mésoglée dans le plan perpendiculaire à l'axe oral-aboral, et l'étirent le long de cet axe oral-aboral (figure 2.25) [60]. Bien que les déformations de la mésoglée lors de la nage soient complexes, le plan de cisaillement lors de la nage correspond au plan de cisaillement employé dans les expériences de macrorhéologie. Aux fréquences des contractions musculaires ( $\sim 1$  rad/s), les résultats de macrorhéologie montrent que la mésoglée est plus élastique que visqueuse ( $G'$  est environ 10 fois plus grand que  $G''$ ). Bien que la microstructure contienne des microenvironnements visqueux (figure 2.21), la structure macroscopique est quasiment purement élastique, ce qui confirme le fait que l'énergie emmagasinée par l'ombrelle à chaque contraction musculaire soit relaxée essentiellement élastiquement [26,60,106,160].



**Figure 2.25** – Schéma des contraintes subies par une tranche cylindrique de mésoglée dans une méduse au repos et en contraction.

### 2.5.3. Vieillissement de la mésoglée

Chaque contraction de la méduse induit une compression notable du réseau fibreux radialement, et un étirement dans la direction orale-aborale, ce qui conduit à un allongement des fibres verticalement. Les contraintes induites par des contractions musculaires répétées modifient progressivement l'architecture du réseau fibreux, et conduisent à la formation et à l'organisation des fibres larges verticales [160].

Nos observations au microscope chez des méduses juvéniles et des méduses adultes ont révélé que les fibres larges verticales sont plus fines chez les méduses juvéniles que chez les méduses adultes. Par ailleurs, nos observations au microscope électronique à balayage ont montré que les fibres larges proviennent de l'assemblage de fibres fines (paragraphe 2.2.2.2.), ce qui fut également observé par Weber et Schmid dans une autre espèce de méduse [160]. Il a par ailleurs été montré dans des gels de collagène reconstitués de Type I que les fibres de collagène s'alignent perpendiculairement à la direction de la contrainte appliquée [117,153]. Ce processus apparaît dès l'échelle microscopique, au niveau des fibres fines. Ces dernières s'agrègent ensuite, pour former des fibres plus larges, qui s'épaississent sous la contrainte au cours du temps. Ces résultats suggèrent que lors du vieillissement de la mésoglée, les fibres fines s'agrègent progressivement, et forment des fibres larges, qui s'épaississent peu à peu au cours du temps.

Dans nos expériences de microrhéologie, les billes piégées dans un microenvironnement assez rigide et presque purement élastique dans la méduse adulte sont sans-doute piégées au milieu de fibres épaisses. Les autres billes bougent plus librement dans la matrice, et leur déplacement quadratique moyen est similaire dans les méduses juvéniles et dans les méduses adultes. Il semble que ces microbilles explorent des microenvironnements d'un maillage lâche de fibres fines qui ne sont encore que peu agrégées entre elles. Nous en déduisons que ce durcissement progressif de la matrice extracellulaire, qui a lieu à l'échelle microscopique, reflète le vieillissement de la mésoglée.

Par ailleurs, nous n'avons observé aucune différence entre les résultats de microrhéologie réalisés dans des méduses juvéniles 1 jour après l'injection et 3 jours après, les méduses juvéniles ayant nagé librement tout ce temps. Cela signifie que le durcissement mécanique des microenvironnements de la matrice extracellulaire, associé à l'agglomération graduelle des fibres, n'est mesurable de manière significative que sur de longues échelles de temps, vraisemblablement de l'ordre de plusieurs semaines.

Notons que si les contractions musculaires favorisent l'agrégation des fibres, les cellules mésoglées, qui tirent, adhèrent et se déplacent dans la matrice extracellulaire, sont vraisemblablement également responsables d'un remodelage progressif de sa structure, conduisant à accroître les inhomogénéités du maillage fibreux et à modifier les propriétés mécaniques de la mésoglée [76,93].

#### **2.5.4. Rôle de la mésoglée dans la croissance des canaux**

Comme nous l'avons vu au paragraphe 2.1., les propriétés viscoélastiques de la matrice extracellulaire jouent un rôle majeur dans les comportements cellulaires, l'organisation des tissus, la morphogenèse et le développement [10,47,73,94,135]. Les processus de migration cellulaire et de morphogenèse ayant lieu à l'échelle microscopique, nous devons considérer les propriétés mécaniques locales de la matrice extracellulaire à l'échelle du micron.

Chez la méduse *Aurelia aurita*, nous avons observé, par des expériences de microrhéologie, que la matrice extracellulaire est assez molle, et présente des propriétés viscoélastiques très hétérogènes à l'échelle microscopique (paragraphe 2.4.3.). Cette hétérogénéité mécanique est vraisemblablement liée à la grande hétérogénéité du maillage fibreux des fibres fines (paragraphe 2.2.2.2.). Par ailleurs, quel que soit l'endroit où nous avons injecté les billes dans la matrice extracellulaire, par rapport à l'organisation du système gastrovasculaire (au voisinage d'un vieux ou d'un jeune canal, ou entre des canaux), nous n'avons relevé aucune différence notable des propriétés mécaniques locales de la matrice. Partout, nous avons observé une grande hétérogénéité des propriétés viscoélastiques à l'échelle microscopique.

Ainsi, il n'apparaît pas qu'un éventuel gradient de rigidité de la matrice ait pu guider un canal dans sa croissance pour le conduire à se connecter aux canaux les plus jeunes. Par ailleurs, l'architecture fibreuse, composée de fibres larges verticales traversant la mésoglée, de fibres

larges tangentielles sous l'ombrelle, et de fibres fines distribuées de manière hétérogène à l'échelle de micron, ne semble pas présenter une organisation susceptible de guider la croissance d'un nouveau canal dans une certaine direction.

Par conséquent, il apparaît que la morphogenèse du réseau gastrovasculaire de la méduse ne peut pas être expliquée simplement et directement à partir de la structure et des propriétés mécaniques de la mésoglée.

C'est pourquoi, dans les chapitres suivants, nous nous sommes intéressé au rôle joué par les autres tissus qui entourent un canal en croissance, à savoir l'endoderme et les muscles. Il nous est apparu que si la mésoglée ne détermine pas directement la direction de croissance d'un canal, elle joue un rôle indirect, en assurant la transmission des contraintes provenant des contractions musculaires dans l'endoderme et les canaux du système gastrovasculaire.

Nous présenterons dans le chapitre 3 notre étude de la structure de l'endoderme, et des processus de croissance d'un canal dans l'endoderme. Puis, dans le chapitre 4, nous montrerons comment les contraintes musculaires transmises à l'endoderme peuvent jouer un rôle important et permettre de comprendre la morphogenèse du système gastrovasculaire.

### 3. L'endoderme et les canaux

Comme nous l'avons vu dans le chapitre 1, les canaux croissent dans l'endoderme, qui est un mince feuillet cellulaire. Afin de comprendre comment s'effectue cette croissance, nous avons cherché à visualiser la structure de l'endoderme, notamment au niveau de sa jonction avec les canaux. Nous avons également visualisé *in vivo*, au cours du temps la croissance d'un canal dans l'endoderme.

Nous avons notamment cherché à comprendre comment une structure tridimensionnelle, comme un canal, pouvait croître dans un feuillet plat, quasi bidimensionnel, comme l'endoderme. L'endoderme est peut-être constitué de deux feuillets monocellulaires accolés, pouvant se détacher l'un de l'autre, afin de permettre à un canal de croître. Nous avons également cherché à comprendre comment s'effectuait cette croissance : les cellules de canal se divisent-elles pour repousser les cellules de l'endoderme et prendre leur place ? Une autre hypothèse serait que les cellules de l'endoderme se divisent et se différencient en cellules de canal.

Nous présenterons dans une première partie les expériences que nous avons réalisées afin de mieux comprendre la structure de l'endoderme et de la jonction canal/endoderme. Dans une seconde partie, nous présenterons les expériences de visualisation de la croissance des canaux dans l'endoderme.

#### 3.1. Structure de l'endoderme et de la jonction canal/endoderme

La structure de l'endoderme et de la jonction entre un canal et l'endoderme chez la méduse sont peu connues. Dans de nombreux travaux, l'endoderme est mentionné comme étant un mince feuillet cellulaire (dénommé 'lamelle endodermique', ou 'endoderme plat'), connecté à tous les canaux [24,25,99,141,160]. Si la structure des canaux, et des cellules ciliées qui les tapissent, sont relativement connues [9,16,61], celle de l'endoderme et notamment de sa jonction avec les canaux, n'a, à notre connaissance, pas été décrite.

Nous exposerons tout d'abord les expériences les plus simples à réaliser, et qui donnent une première idée de l'organisation de l'endoderme et des canaux: les observations *in vivo* au microscope optique, par microscopie à fluorescence et à contraste interférentiel différentiel. Puis, nous présenterons les visualisations de coupes histologiques. Enfin, nous détaillerons les observations réalisées au microscope électronique, à balayage, et à transmission.

### 3.1.1. Visualisation *in vivo* par microscopie à fluorescence

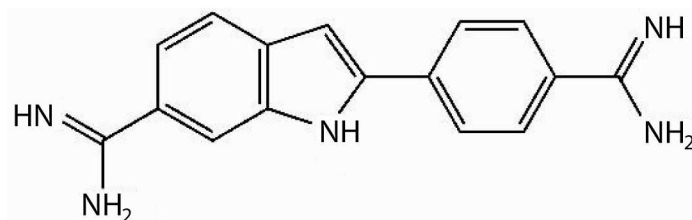
La microscopie à fluorescence permet l'observation d'échantillons fluorescents. Certaines structures cellulaires de l'échantillon biologique à observer peuvent en effet être rendues fluorescentes par marquage par des molécules fluorescentes.

Le principe de la microscopie à fluorescence est détaillé en annexe A.

#### 3.1.1.1. Protocole

Les expériences ont été effectuées sur des méduses juvéniles. Comme nous l'avons mentionné au chapitre 2 (paragraphe 2.1.3.), une méduse juvénile est une méduse qui vient de quitter le stade éphyrule pour atteindre le stade méduse ; son ombrelle est donc ronde, elle a un diamètre de l'ordre de 1 cm, et son âge se situe entre 3 semaines et 1 mois.

Afin d'observer la structure cellulaire de l'endoderme, nous avons marqué les noyaux des cellules de la méduse. Nous avons pour cela utilisé le DAPI, ou 4',6'-diamidino-2-phénylindole, qui est une molécule fluorescente capable de se lier à l'ADN (figure 3.1). Le DAPI absorbe la lumière UV et émet une fluorescence bleue. Il permet de détecter l'ADN, et donc de visualiser le noyau des cellules.



**Figure 3.1** – Structure du DAPI.

Les cellules d'une méduse juvénile sont marquées en faisant nager la méduse pendant 30 minutes dans un microtube contenant une solution de DAPI (Invitrogen, D1306) à 70  $\mu\text{mol/L}$ , dans de l'eau de mer artificielle. Nous obtenons 1 mL de cette solution en mélangeant 1 mL d'eau de mer artificielle à 5  $\mu\text{L}$  d'une solution mère de DAPI à 5 mg/mL (soit 14 mmol/L).

La méduse est ensuite paralysée en étant immergée pendant 10 minutes dans une solution de  $\text{MgCl}_2$  à 7.5% en volume, diluée dans un rapport 1/1 par de l'eau de mer artificielle.

La méduse est alors placée sur une lamelle de verre, ombrelle étalée, dans la même position que celle utilisée pour les expériences de microrhéologie (chapitre 2, figure 2.14). Afin que la



méduse ne glisse pas trop sur la lamelle, nous retirons à l'aide d'une pipette un maximum d'eau de mer autour d'elle, sans l'abîmer.

Les méduses sont observées par un microscope à fluorescence (Leica, DMI 3000 B), équipé de filtres permettant de voir le DAPI (cube de filtres Leica A4). Le filtre d'excitation sélectionne les UV (Bande Passante centrée sur 360 nm, de largeur 40 nm), et le filtre d'arrêt ne laisse passer que la lumière émise, qui est dans le bleu (Bande Passante centrée sur 470 nm, de largeur 40 nm). Les noyaux des cellules sont observés par un objectif à immersion grossissant 63X (Leica, PL APO 63X/1.30 GLYC CORR). Les images sont acquises par une caméra CCD de haute résolution (Andor, iXon3 885). La fluorescence des cellules de l'endoderme, plongées dans la mésoglée, étant assez faible, un temps d'acquisition de la caméra de 1 seconde est nécessaire pour pouvoir les visualiser correctement. La méduse doit être immobile pendant ce temps, afin que l'image soit nette. C'est pourquoi il est indispensable de la paralyser et de retirer l'eau qui l'entoure afin de limiter son glissement. La méduse peut être observée pendant une dizaine de minutes. Au-delà, elle commence à sécher, et doit être réhydratée par quelques gouttes d'eau de mer pour pouvoir être maintenue en vie. Après avoir été observée, la méduse peut être replacée dans l'eau de mer, et nager à nouveau librement. Macroscopiquement, le DAPI ne semble pas avoir altéré la méduse, qui peut continuer à vivre normalement.

### **3.1.1.2. Résultats**

La figure 3.2 B est une visualisation des noyaux des cellules de l'endoderme et d'un canal, marqués au DAPI. Nous pouvons observer que les parois des canaux sont formées de nombreuses cellules, très proches les unes des autres. *A contrario*, la densité cellulaire dans l'endoderme est beaucoup plus faible. Les noyaux des cellules sont très éloignés les uns des autres (sur la figure 3.2 B, ils sont espacés entre eux d'une distance de l'ordre de 40  $\mu$ m). Les cellules de l'endoderme peuvent même sembler isolées les unes des autres. Ce n'est en fait pas le cas, comme nous le verrons par la suite.

Nous avons essayé de marquer les membranes des cellules de l'endoderme, afin de déterminer l'épaisseur cellulaire du feuillet endodermique. Nous avons essayé plusieurs marqueurs membranaires. Le Bodipy (Invitrogen, C34556) et le Di-4-Anepps (Invitrogen, D1199) se sont avérés être de bons marqueurs chez la méduse. Malheureusement, si les membranes des cellules ectodermiques étaient bien marquées, les membranes des cellules de l'endoderme n'étaient que très faiblement visibles, et ce même après une augmentation de la concentration du marqueur ou du temps de marquage.

### **3.1.2. Visualisation *in vivo* par microscopie à contraste interférentiel différentiel**

Il est cependant possible, dans de bonnes conditions d'observation, de visualiser les membranes des cellules de l'endoderme par microscopie à contraste interférentiel différentiel.

Le principe de la microscopie à contraste interférentiel différentiel est décrit en annexe A.

#### **3.1.2.1. Protocole**

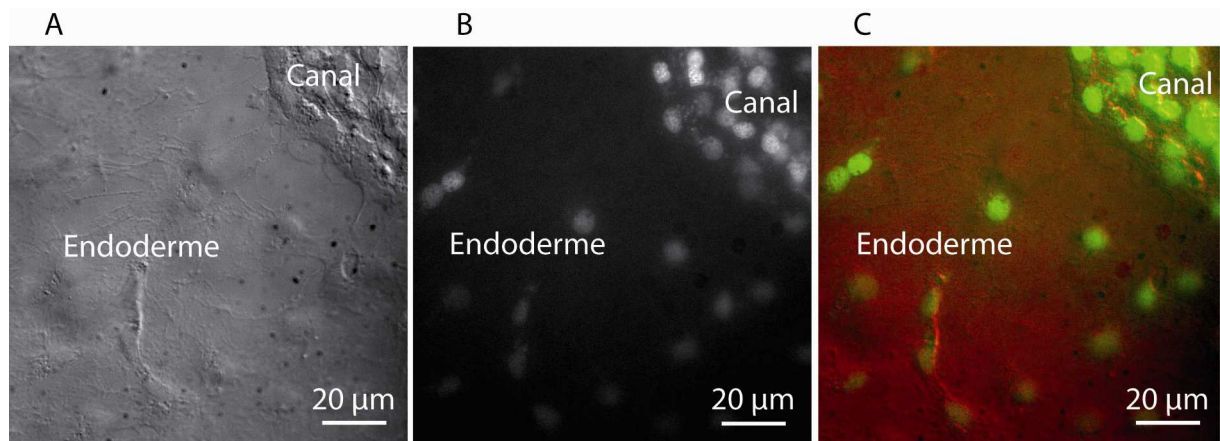
Comme précédemment, les expériences ont été effectuées sur des méduses juvéniles entières, d'environ 1 cm de diamètre, et âgées d'environ 1 mois. La méduse est paralysée par immersion pendant 10 minutes dans une solution de  $MgCl_2$  à 7.5% en volume, diluée dans un rapport 1/1 par de l'eau de mer artificielle. Elle est ensuite placée sur une lamelle de verre, ombrelle étalée, toujours dans la même position que celle utilisée pour les expériences de microrhéologie (chapitre 2, figure 2.14). L'eau de mer autour de la méduse est retirée, afin qu'elle ne glisse pas trop sur la lamelle.

Les méduses sont observées par un microscope à contraste interférentiel différentiel (Leica, DMI 3000 B) et un objectif grossissant 20X (Leica, PL Fluotar 20X/0.40 Corr). Les images sont acquises par une caméra CCD de haute résolution (Andor, iXon3 885).

#### **3.1.2.2. Résultats**

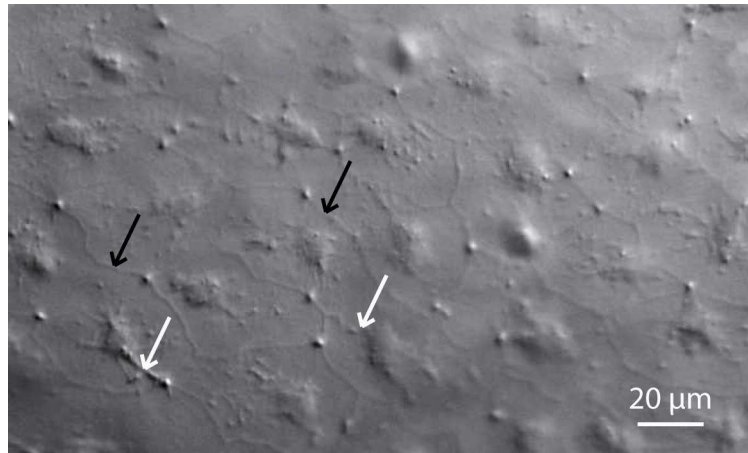
La figure suivante (figure 3.2) est une visualisation des cellules de l'endoderme et d'un canal. Une visualisation de la même région en microscopie à fluorescence et en microscopie à contraste interférentiel différentiel permet de mettre en évidence le fait que les bosses observées en microscopie à contraste interférentiel différentiel (figure 3.2 A) correspondent aux noyaux des cellules, visibles en microscopie à fluorescence (figure 3.2 B).

Nous pouvons observer sur la figure 3.2 A que, comme précédemment, les parois des canaux sont formées de nombreuses cellules, très proches les unes des autres, et que les cellules de l'endoderme sont moins 'tassées' les unes contre les autres.

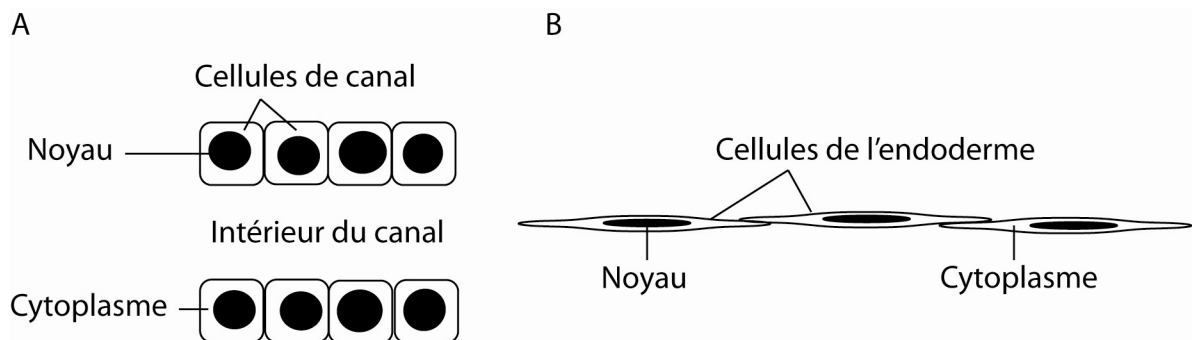


**Figure 3.2** – *Visualisation de l'endoderme et d'un canal. À gauche (A) : visualisation par microscopie à contraste interférentiel différentiel. Au milieu (B) : visualisation par microscopie à fluorescence. À droite (C) : images A et B combinées, l'image A étant en rouge et la B en vert.*

Sur la figure 3.3, nous pouvons également observer certaines parois cellulaires. Elles sont indiquées par des flèches noires et blanches. Nous observons que ces parois ne semblent pas mettre en évidence une structure dans laquelle les cellules seraient simplement accolées les unes aux autres. Notamment, certaines parois cellulaires peuvent passer par-dessus le cytoplasme et le noyau des cellules voisines (flèches blanches sur la figure 3.3). Ainsi, les cellules semblent plutôt être 'les unes sur les autres' que 'les unes à côté des autres', comme semblent l'être les cellules des canaux (figure 3.4). Il est difficile de déterminer si le feuillet endodermique est ou non d'épaisseur monocellulaire. Par ailleurs, si les cellules des canaux sont petites et rondes, d'une taille de l'ordre de 10 µm, les cellules de l'endoderme sont beaucoup plus grandes, d'une taille de l'ordre de 50 µm, et très plates. Elles semblent avoir un noyau circulaire protubérant, d'une taille de l'ordre de 10 µm, entouré par un corps cytoplasmique très fin, et très étalé. Nous pouvons nous les représenter comme ayant l'allure d'un 'œuf au plat', comme représenté sur la figure 3.4 (sur cette figure, nous avons choisi de représenter l'endoderme et les parois du canal comme des feuillets monocellulaires, ce qui sera justifié par la suite). Ces diverses observations seront confirmées et étayées par les observations réalisées en microscopie électronique à transmission (paragraphe 3.1.5.).



**Figure 3.3** – Visualisation de l’endoderme par microscopie à contraste interférentiel différentiel. Les flèches noires et blanches indiquent des membranes cellulaires. Les flèches blanches indiquent des parois cellulaires qui passent par-dessus le cytoplasme des cellules voisines.



**Figure 3.4** – Schéma des structures cellulaires d’un canal et de l’endoderme.

Les expériences de visualisation par microscopie optique ont montré que les cellules des canaux sont rondes, tassées densément les unes contre les autres, et semblent jointives ; celles de l’endoderme sont plates, plus grandes, et le cytoplasme d’une cellule de l’endoderme peut glisser par-dessus celui de sa voisine.

Si ces expériences donnent des renseignements sur la structure des canaux et de l’endoderme, elles ne donnent pas d’information sur la structure de la jonction canal/endoderme.

Afin de mieux comprendre l’organisation des cellules de l’endoderme, des canaux, et de la jonction entre un canal et l’endoderme, il est nécessaire de réaliser des coupes longitudinales

de la méduse, à travers l'endoderme, les canaux, et la jonction canal/endoderme. Nous avons visualisé les structures cellulaires par des coupes histologiques, et des expériences de microscopie électronique à balayage et à transmission.

### **3.1.3. Visualisation de coupes histologiques**

#### **3.1.3.1. Principe**

Le principe est de fixer une méduse juvénile, puis de remplacer le liquide qui la baigne par de la cire liquide. Cette dernière refroidit, se solidifie, et la méduse est alors prise dans la cire. À l'aide d'un microtome, des coupes longitudinales de quelques microns d'épaisseur sont réalisées, puis observées avec un microscope optique. Les expériences d'histologie ont été réalisées avec l'aide d'Alexis Peaucelle et de Nathalie Luciani.

#### **3.1.3.2. Protocole**

Comme nous l'avons vu au chapitre 2 (paragraphe 2.2.2.1.), les méduses juvéniles entières sont fixées par une solution de glutaraldéhyde à 5%, dans une solution de cacodylate à 0.1 mol/L [24]. Afin que la fixation puisse être efficace, les échantillons sont immergés dans le fixatif pendant 1 h à température ambiante, puis toute la nuit à 4°C. Les échantillons sont ensuite rincés. La solution de rinçage est une solution de cacodylate à 0.5 mol/L. Les échantillons sont rincés une première fois pendant 1 h à 4°C, puis une seconde fois toute la nuit à 4°C.

La solution de rinçage dans laquelle baignent les échantillons est alors remplacée progressivement par de l'éthanol à 95%. À cette fin, les échantillons sont immergés, à 4°C, dans des bains successifs de 30 min chacun, dans lesquels la concentration de la solution de rinçage diminue tandis que celle de l'éthanol à 95% augmente. Une fois que les échantillons sont dans un bain d'éthanol à 95%, ils sont transférés, à 4°C, dans une solution d'éthanol à 95% contenant de l'éosine, afin de colorer les méduses. Ces dernières ne seront alors plus transparentes et elles seront visibles, une fois qu'elles seront immergées dans les blocs de cire. Les échantillons sont ensuite immergés pendant 20 min dans un bain d'éthanol absolu à température ambiante. L'éthanol absolu, qui est bien miscible avec la cire fondue, est par la suite remplacé par cette dernière. Pour cela, les échantillons sont tout d'abord placés dans un bain de 50% de cire fondue et 50% d'éthanol, à 50°C, pendant toute la nuit. Cette température est suffisante pour faire fondre la cire mais n'est pas trop importante, afin de ne pas la dépolymériser. Les échantillons sont ensuite placées dans de la cire fondue pure, à 50°C, pendant 3 h. Cette solution de cire fondue pure est changée, et les échantillons sont immergés

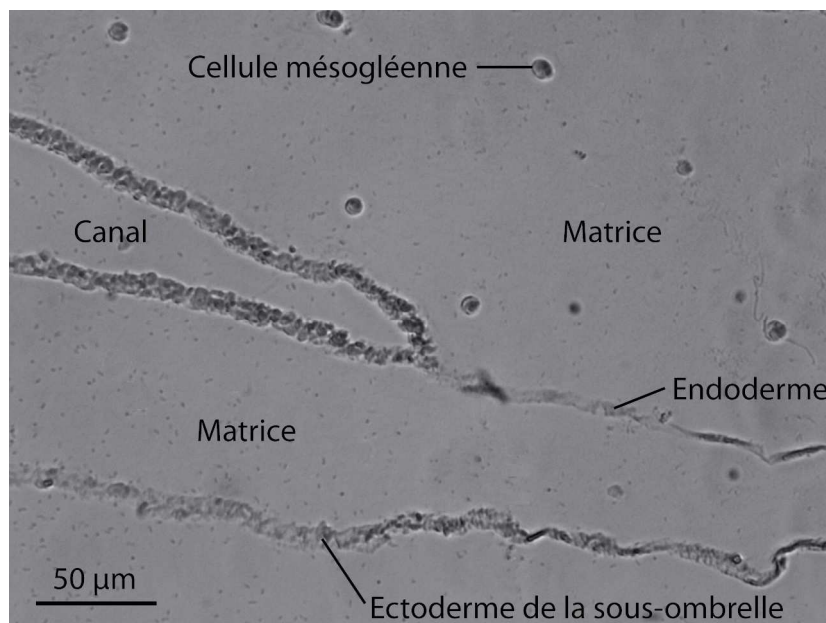
dans cette nouvelle solution, à 50°C, pendant toute la nuit. Les échantillons, dans la cire, sont alors refroidis à température ambiante.

Ces échantillons sont alors coupés par un microtome. Cet appareil permet de découper le bloc de cire contenant les méduses en de fines lamelles d'environ 4 µm d'épaisseur. Ces lamelles sont alors déposées sur des lames de verre, auxquelles elles adhèrent. Ces lamelles sont des tranches de couches cellulaires de la méduse, entourées de cire. Cette cire est retirée progressivement en la dissolvant dans des solutions d'éthanol. Les lames sont d'abord plongées dans plusieurs bains d'éthanol absolu, de 5 min chacun, puis dans des bains successifs de 5 min, dans lesquels la concentration d'éthanol diminue et celle de la solution de rinçage de cacodylate augmente. Quand les lames sont dans la solution pure de cacodylate, elles peuvent être retirées : les couches cellulaires adhèrent toujours aux lames, et la cire a été rincée. Les structures cellulaires sur les lames peuvent alors être visualisées.

### **3.1.3.3. Résultats**

Nous avons réalisé des coupes longitudinales de méduses juvéniles, en commençant les coupes depuis le bord de l'ombrelle, et en avançant vers le centre de la méduse. Ainsi, certaines de nos coupes coupent de haut en bas des canaux, l'endoderme, et les jonctions entre un canal et l'endoderme. Ces coupes ont été visualisées avec un microscope optique, un objectif grossissant 20X, et une caméra CCD (Andor, iXon3 885).

La figure suivante (figure 3.5) montre une coupe longitudinale d'une méduse juvénile, à travers un canal et l'endoderme. L'endoderme apparaît comme un feuillet continu. Ainsi, les cellules de l'endoderme sont connectées entre elles. Mais ces connections, et les limites entre cellules de l'endoderme, ne sont pas visibles à cette résolution (ni avec l'objectif grossissant 63X). Il n'est donc encore pas possible de comprendre la structure cellulaire de l'endoderme. Par contre, nous pouvons observer que les canaux sont constitués de parois d'épaisseur monocellulaire. Nous observons également que, comme nous l'avons exposé au chapitre 1, les couches cellulaires (ectoderme, endoderme, parois des canaux), sont entourées par la matrice extracellulaire, qui contient des cellules mésogléennes, éparses. Cette matrice n'est pas visible en tant que telle, car les fibres sont très fines, comme nous l'avons vu au chapitre 2. Si nous ne visualisons pas les fibres de la matrice, les cellules mésogléennes sont visibles, comme indiqué sur la figure 3.5. Par ailleurs, la jonction entre le canal et l'endoderme est visible. À cette résolution, il n'est malheureusement pas possible de déterminer exactement comment sont agencées les cellules au niveau de cette jonction, et de comprendre comment le canal peut grandir dans le mince feuillet qu'est l'endoderme.



**Figure 3.5** – *Coupe histologique permettant de visualiser la connexion entre un canal et l’endoderme.*

Afin de visualiser précisément la structure de l’endoderme, et de la jonction entre un canal et l’endoderme, nous avons réalisé des expériences de microscopie électronique à balayage et à transmission.

### **3.1.4. Visualisation par microscopie électronique à balayage**

Le principe de la microscopie électronique à balayage (MEB) est exposé en annexe A. Cette technique permet de visualiser, avec une très grande résolution, les détails de la surface d’un échantillon. Nous avons découpé un morceau de l’ombrelle d’une méduse juvénile entière, afin de visualiser la tranche d’un canal, de l’endoderme, et de la jonction entre un canal et l’endoderme.

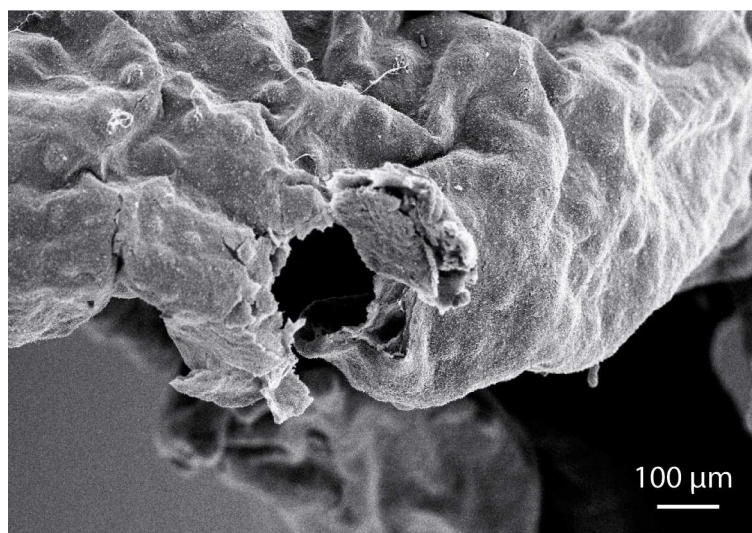
#### **3.1.4.1. Protocole**

Le protocole est en grande partie similaire à celui exposé au chapitre 2 (paragraphe 2.2.2.1.). La préparation des échantillons et leur observation ont été réalisées sur la plateforme de microscopie électronique à balayage du bâtiment de chimie de l’Université Paris VII, avec David Montero. Les méduses juvéniles sont fixées, puis déshydratées et séchées. Avant de métalliser les méduses, nous avons découpé délicatement un bout du bord de leur ombrelle à

l'aide d'une fine aiguille, sous une loupe binoculaire. Nous pouvons ainsi visualiser en coupe longitudinale le canal circulaire, et sa connexion avec l'endoderme. Nous pouvons également observer la structure de la matrice, et ses attaches fibreuses avec les structures cellulaires. Après ces découpes, les échantillons sont métallisés par du platine. Les observations sont ensuite réalisées avec un microscope électronique à balayage à émission par effet de champ (microscope MEB Zeiss Supra 40). L'interprétation des résultats a été réalisée avec l'aide d'Alexis Peaucelle.

#### **3.1.4.2. Résultats**

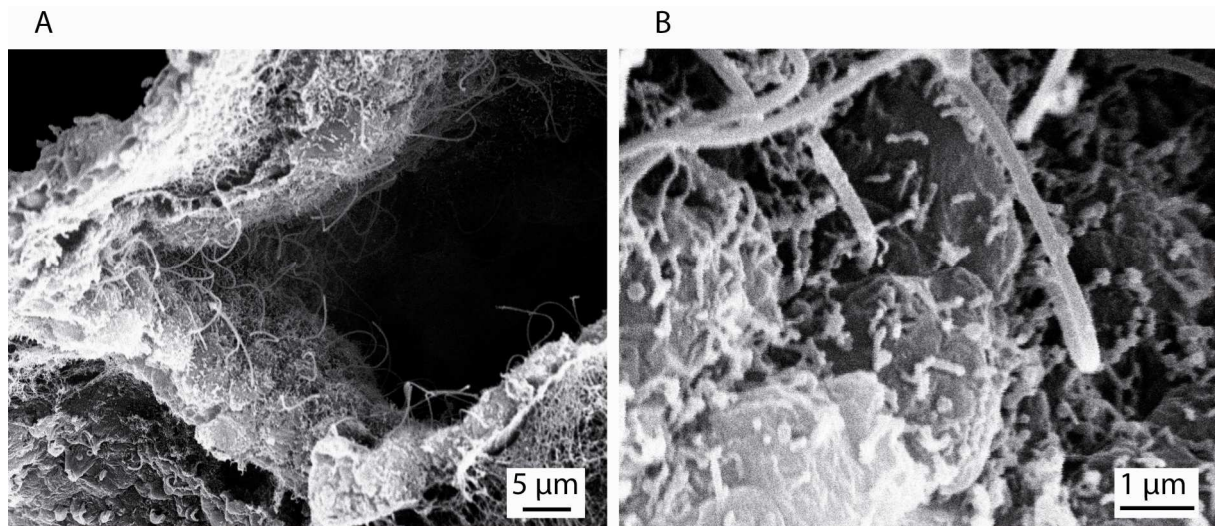
La figure suivante (figure 3.6) représente une image du bord de l'ombrelle d'une méduse juvénile observée au microscope électronique à balayage. Nous observons la zone où le bord de l'ombrelle a été découpé, afin de pouvoir observer le canal circulaire et sa jonction avec l'endoderme.



**Figure 3.6** – Visualisation par MEB du bord de l'ombrelle d'une méduse et de la zone découpée et soulevée.

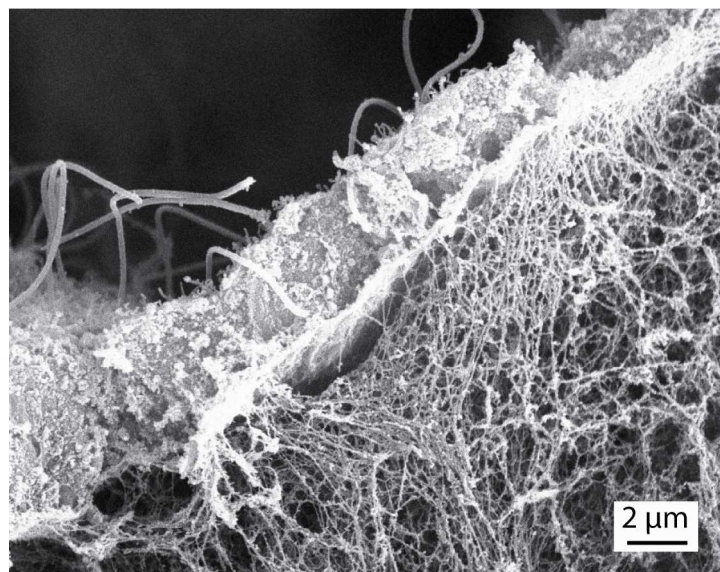
La figure 3.7 A correspond à une vue détaillée du canal circulaire observé sur la figure précédente (figure 3.6). Elle présente une vue de l'intérieur du canal circulaire. Nous pouvons observer les cellules ciliées, qui constituent la paroi du canal circulaire. Les cils de ces cellules apparaissent nettement. Ces cils permettent de faire circuler l'eau et la nourriture dans les canaux [9,16,118,146]. La figure 3.7 B correspond à une vue détaillée des cellules de la paroi du canal circulaire. Nous pouvons observer que ces cellules apparaissent comme rondes, et présentent de nombreuses microvillosités à leur surface, qui ont été vues dans le système gastrovasculaire d'autres cnidaires [61,111]. Les cils sont également clairement visibles.





**Figure 3.7** – Visualisation par MEB du canal circulaire. À gauche (A) : vue d'ensemble du canal circulaire. À droite (B) : vue en détail des cellules du canal circulaire.

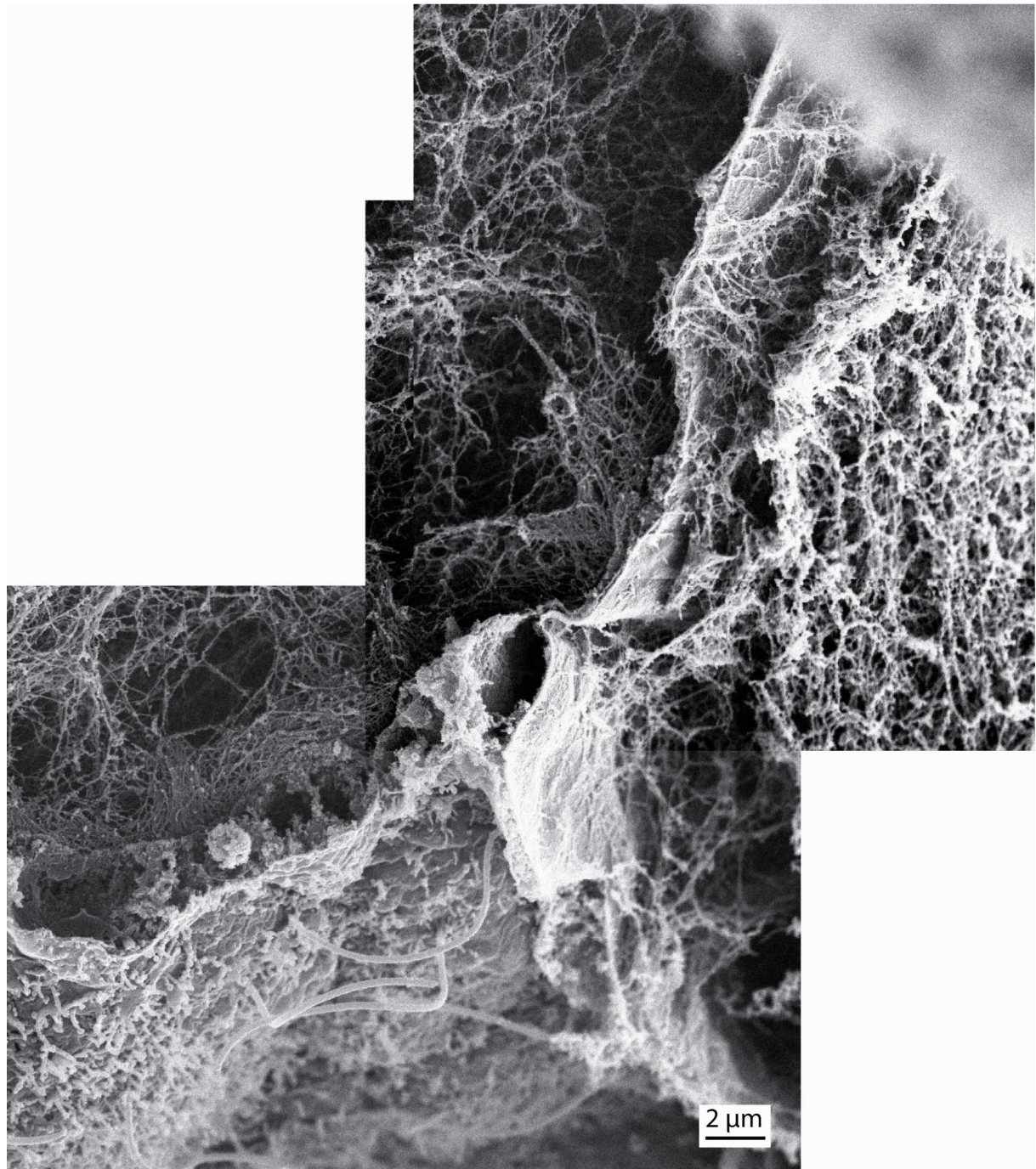
La figure 3.8 présente une vue du bord du canal circulaire et de la matrice. Nous observons les attaches entre les cellules des parois des canaux et les fibres de la matrice.



**Figure 3.8** – Visualisation par MEB de l'attache entre les cellules du canal circulaire et les fibres de la matrice.

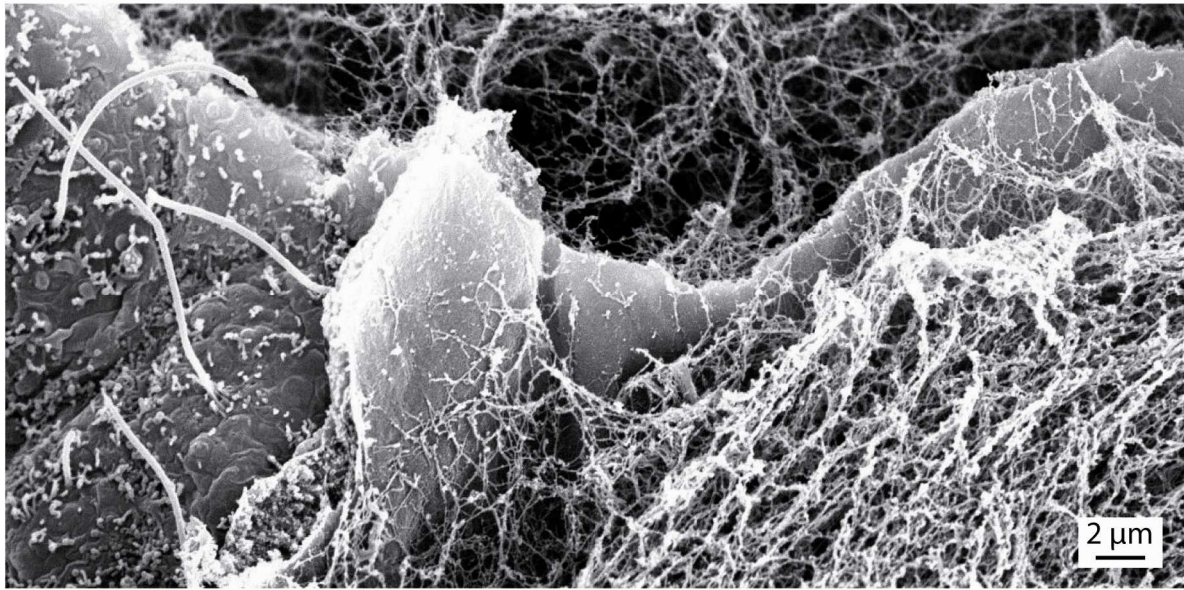
La figure 3.9 présente une vue d'une tranche du canal circulaire, de l'endoderme et de la jonction entre canal et endoderme. Cette figure est un assemblage de 3 images au microscope électronique à balayage. Nous observons que l'endoderme apparaît comme une très fine couche cellulaire, directement connectée au canal circulaire. Nous observons également les

connexions entre les fibres de la matrice et les cellules de l'endoderme. La figure 3.10 est un assemblage de deux observations au MEB. Elle constitue une vue sous un autre angle de la connexion entre canal et endoderme. Nous observons les cellules ciliées des canaux, et les attaches entre les fibres de la matrice et les cellules des canaux et de l'endoderme. Malheureusement, les figures 3.9 et 3.10 ne permettent pas de comprendre précisément la structure de la connexion entre les canaux et l'endoderme.



**Figure 3.9** – Visualisation par MEB de la jonction entre les cellules des canaux (en bas) et de l'endoderme (en haut), vue de côté.





**Figure 3.10** – *Visualisation par MEB de la jonction entre les cellules des canaux (à gauche) et de l’endoderme (à droite), vue par au-dessus. Les attaches des fibres de la matrice aux cellules sont bien visibles.*

### **3.1.5. Visualisation par microscopie électronique à transmission**

Les expériences de microscopie électronique à balayage ont permis de bien visualiser les cellules ciliées des canaux, et les attaches des fibres aux canaux et à l’endoderme. Afin de mieux visualiser la structure de l’endoderme, et de la jonction entre un canal et l’endoderme, nous avons réalisé des coupes et les avons observées au microscope électronique à transmission.

#### **3.1.5.1. Principe**

Nous avons exposé en annexe A le principe de la microscopie électronique à balayage. Le principe de la microscopie électronique à transmission (MET) est analogue. La différence réside dans le fait que les électrons observés ne sont pas les électrons secondaires comme pour la MEB, mais les électrons transmis, résultats de diffusions élastiques et inélastiques. Afin que le faisceau puisse être transmis, l’échantillon doit être mince. C’est pourquoi, en microscopie électronique à transmission, nous observons des fines coupes de méduse, et non des méduses entières. Cette technique permet de visualiser, avec une très grande résolution, les détails des coupes. Nous avons observé des coupes longitudinales de méduses, afin de visualiser les coupes de canaux, de l’endoderme, et de la jonction canal/endoderme.

### 3.1.5.2. *Protocole*

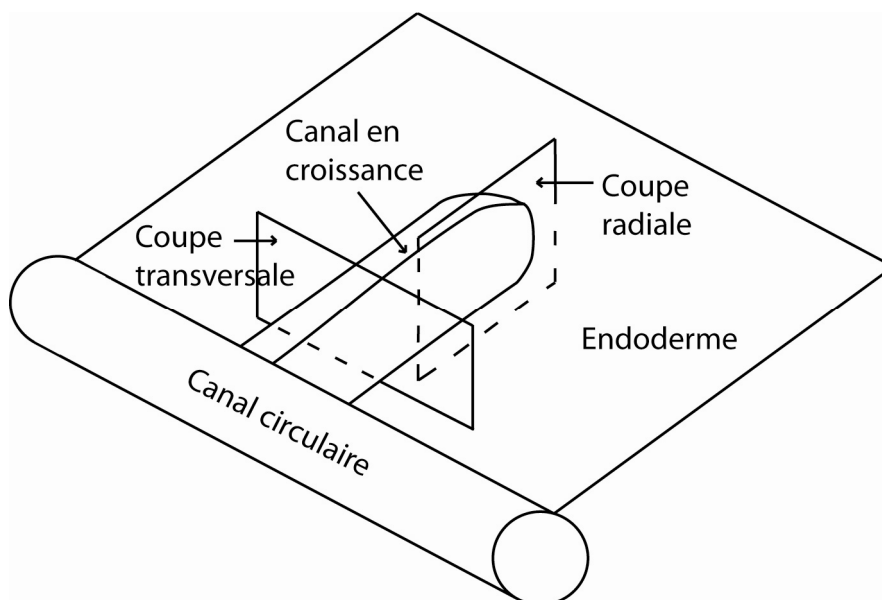
La microscopie électronique à transmission nous a permis de visualiser en coupe la structure de l'endoderme, des canaux, et de la jonction canal/endoderme au niveau d'un canal en croissance. La préparation des échantillons et leur visualisation ont été réalisées sur la plateforme de microscopie électronique de l'Institut Jacques Monod de l'Université Paris VII, avec Alexis Canette. L'interprétation des résultats a été réalisée avec l'aide d'Alexis Canette, d'Alexis Peaucelle et de Stefano Tiozzo. Spécialiste de la préparation et de la visualisation d'échantillons biologiques en MET, Alexis Canette nous a beaucoup aidées à élaborer un protocole permettant de préparer au mieux les méduses pour l'observation en MET. Nous détaillons ici ce protocole.

Nous avons fixé des méduses juvéniles entières, présentant des canaux en croissance. La solution de fixatif était une solution de glutaraldéhyde à 3% et de paraformaldéhyde à 1%, dans une solution de cacodylate à 0.15 mol/L, avec 0.5% d'acide tannique, 0.5 mmol/L de chlorure de calcium, et 3% de sucrose [99]. 50 mL d'une telle solution étaient obtenus en mélangeant 6 mL de glutaraldéhyde à 25%, 3.1 mL de paraformaldéhyde à 16%, à 37.5 mL de cacodylate à 0.2 mol/L. Étaient ajoutés 250 mg d'acide tannique, 2.8 mg de chlorure de calcium (de masse molaire 111 g/mol), 1.5 g de sucrose, et environ 3.4 mL d'eau pour obtenir 50 mL. L'osmolarité de cette solution, mesurée par un osmomètre, est voisine de 1000 mOsm, donc a une osmolarité voisine de celle de l'eau de mer artificielle de nos aquariums. Les échantillons sont immergés dans le fixatif pendant 2 h à température ambiante. Ils sont ensuite rincés 3 fois, pendant 5 min, dans une solution de cacodylate à 0.15 mol/L. Les méduses entières sont ensuite découpées sous la loupe binoculaire, afin d'obtenir des morceaux de bord d'ombrelle contenant le canal circulaire, quelques canaux radiaux, et des canaux en croissance.

Les échantillons sont ensuite post-fixés pendant 1 h à température ambiante dans une solution d'osmium à 1% dans du cacodylate à 0.15 mol/L, puis rincés 2 fois, pendant 10 min, dans une solution de cacodylate à 0.15 mol/L. Les échantillons sont alors déshydratés dans une série de solutions de concentration croissante d'éthanol (de 50% à 70% d'éthanol) dans du cacodylate à 0.15 mol/L, pendant une durée de 10 min pour chaque concentration. Les échantillons sont ensuite immergés pendant 30 min dans une solution d'éthanol à 70% dans du cacodylate à 0.15 mol/L. Ils sont alors déshydratés et imprégnés par transfert pendant 1 h dans un mélange de cette solution d'éthanol à 70% avec de la résine LR White, dans un rapport 2-1 ; puis par immersion pendant toute une nuit dans un mélange de la solution d'éthanol à 70% avec la résine LR White dans un rapport 1-2. Afin d'achever l'imprégnation, les échantillons sont plongés à deux reprises pendant 1 h dans la solution de LR White pure. Enfin, la résine polymérise en plaçant les échantillons en présence d'un catalyseur pendant 18 h, à 60°C.

Les blocs de résine contenant les échantillons d'ombrelle de méduse sont ensuite observés sous la loupe binoculaire. Les canaux apparaissent très clairement, et il est possible de déterminer la localisation des canaux en croissance. Les blocs de résine sont alors découpés au moyen d'un ultramicrotome (Leica Microsystems), jusqu'à arriver au niveau d'un canal en

croissance. Les coupes sont longitudinales. Dans un cas, les coupes sont radiales, afin de couper un canal en croissance dans sa longueur. Dans l'autre, elles sont transversales, afin de couper un canal en croissance dans sa largeur (figure 3.11). Nous avons réalisé 5 coupes transversales, sur deux canaux en croissance, et deux coupes radiales, sur deux canaux en croissance.



**Figure 3.11** – Schéma de l'orientation des coupes de TEM d'un canal en croissance.

Au fur et à mesure de l'avancée des coupes dans le bloc de résine, des coupes 'épaisses' sont d'abord réalisées, afin de repérer la zone découpée. Puis, quand une zone intéressante est atteinte, notamment au niveau de la jonction entre canal et endoderme, des coupes ultrafines (de 80 nm d'épaisseur) sont réalisées. Notons que les coupes transversales permettent d'observer tout d'abord des jonctions canal/endoderme au milieu du canal en croissance, puis à son extrémité. Nous avons vérifié que si nous poursuivions ces coupes transversales au-delà de l'extrémité du canal, nous atteignons l'endoderme, ce qui nous a permis de vérifier que nous réalisions bien des coupes transversales d'un canal en croissance (un canal qui a une extrémité, et n'est pas encore connecté aux autres canaux).

Les coupes ultrafines sont ensuite marquées pendant 20 min avec une solution d'acétate d'uranyle, puis pendant 2 min dans une solution de citrate de plomb selon Reynolds [130]. Elles sont enfin observées à 80 kV par un microscope électronique à transmission (Phillips Tecnai), au moyen d'une caméra CCD (Olympus Keenview). Les coupes 'épaisses' peuvent quant à elles être observées par microscopie optique, et permettent de se 'repérer' dans les coupes observées au microscope électronique à transmission.

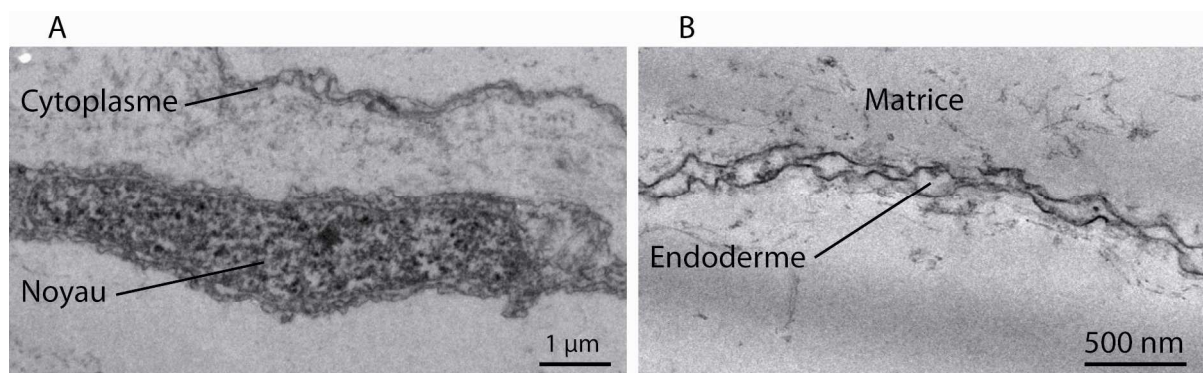
### 3.1.5.3. Résultats

#### L'endoderme

Les observations au microscope électronique à transmission nous ont tout d'abord permis de visualiser la structure de l'endoderme. Les coupes permettent de visualiser le cytoplasme, et parfois le noyau des cellules endodermiques. Elles permettent également de déterminer localement si l'endoderme est une monocouche cellulaire. Nous avons observé qu'au voisinage de l'extrémité d'un canal en croissance, les cellules de l'endoderme étaient empilées les unes sur les autres. Par contre, ailleurs, (loin d'un canal, ou au voisinage de sa paroi mais loin de son extrémité), l'endoderme est une monocouche cellulaire et les cellules sont connectées entre elles sur leur pourtour. Les connections entre cellules se font par des jonctions serrées.

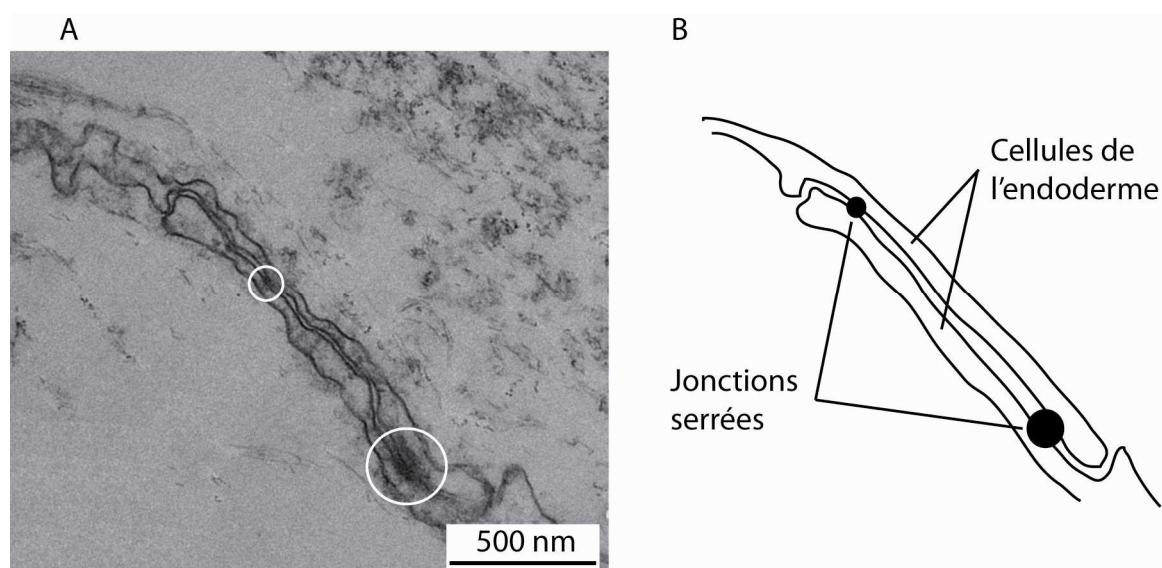
La figure 3.12 A présente une image d'une cellule de l'endoderme, loin de l'extrémité d'un canal en croissance. Nous pouvons observer son noyau, et son cytoplasme, très fin. Le cytoplasme est replié 'au dessus' du noyau, car la préparation de l'échantillon a comprimé l'endoderme, et ce dernier ondule à certains endroits. Cette cellule est entourée par des fragments fibreux, qui correspondent à des coupes des fibres de la matrice extracellulaire. Ces observations confirment les observations réalisées *in vivo* en microscopie à contraste interférentiel différentiel, qui montrent que les cellules endodermiques semblent avoir un noyau circulaire protubérant, entouré par un corps cytoplasmique très fin, et très étalé (paragraphe 3.1.2.2.) ; ces cellules ont l'allure d'un 'œuf au plat'.

La figure 3.12 B présente une image de l'endoderme au voisinage de la paroi d'un canal en croissance, loin de l'extrémité du canal. Nous pouvons observer le cytoplasme d'une cellule endodermique. Les lignes noires correspondent aux membranes cellulaires. L'endoderme est donc une monocouche cellulaire. Il est entouré par le réseau fibreux de la matrice.



**Figure 3.12** – Visualisation par MET de l'endoderme, loin de l'extrémité du canal en croissance. À gauche (A) : noyau et cytoplasme d'une cellule de l'endoderme. À droite (B) : cytoplasme d'une cellule de l'endoderme.

La figure 3.13 présente une image de l'endoderme au voisinage de la paroi d'un canal en croissance, loin de son extrémité. La figure 3.13 B est un schéma simplificateur de la figure 3.13 A. Nous pouvons observer les extrémités du cytoplasme de deux cellules endodermiques, et leur connexion. Sur la figure 3.13, les lignes noires correspondent toujours aux membranes cellulaires. Nous pouvons observer que l'endoderme est une monocouche cellulaire, sauf au niveau de la connexion entre deux cellules, où localement l'endoderme est une bicouche cellulaire. Nous observons que les cellules sont connectées entre elles au niveau de leur cytoplasme, sur leur pourtour. Ces connexions se font par des jonctions serrées, repérables par les zones noires entourées par des cercles blancs sur la figure 3.13 A.



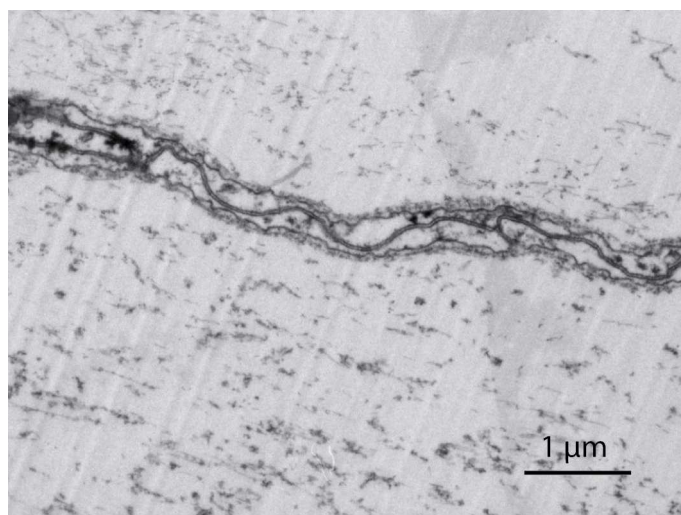
**Figure 3.13** – Visualisation de la connexion entre deux cellules de l'endoderme, loin de l'extrémité du canal en croissance. À gauche (A) : visualisation par MET. À droite (B) : schématisation de la figure A.

La figure 3.14 présente une image de l'endoderme au voisinage de l'extrémité d'un canal en croissance. Les lignes noires correspondent toujours aux membranes cellulaires. Nous pouvons observer une imbrication et une superposition du cytoplasme de différentes cellules endodermiques. Les marques parallèles sont des artefacts, correspondant à des marques laissées par la lame découpant la résine pour réaliser les coupes.

Stefano Tiozzo nous a fait remarquer que nous pouvions observer sur cette figure (figure 3.14) la membrane basale, qui correspond au réseau plus dense de fibres, qui entoure les cellules. Rappelons que la membrane basale est une matrice extracellulaire particulière, présente à la jonction entre un épithélium et un autre tissu (ici l'endoderme et la mésogée), et qui permet notamment la cohésion structurale de l'épithélium. Ici, nous observons que la membrane basale est présente au-dessus et en-dessous des cellules endodermiques, et contribue vraisemblablement à maintenir la structure plate de l'endoderme. Mentionnons que cette membrane basale était peu visible sur les images présentées précédemment (figures 3.12



et 3.13), car celles-ci avaient été réalisées alors que le protocole de fixation et de préparation des échantillons de méduse n'avait pas encore été optimisé. La membrane basale avait donc sans-doute alors été arrachée lors de la préparation des échantillons. Dans les images de MET présentées par la suite, la membrane basale pourra être visible.



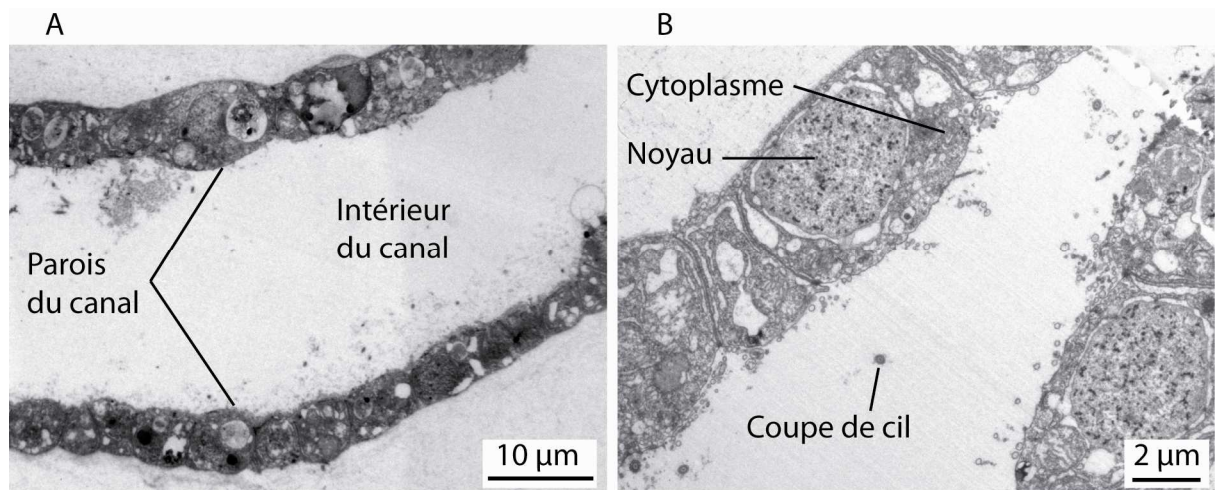
**Figure 3.14** – *Visualisation par MET de l'endoderme près de l'extrémité d'un canal en croissance. L'empilement et l'imbrication des cytoplasmes des cellules de l'endoderme sont visibles.*

### Les canaux

Les observations au microscope électronique à transmission nous ont également permis d'étudier la structure des canaux. Les coupes permettent de visualiser la forme et l'organisation des cellules des canaux.

La figure 3.15 A montre une coupe radiale à travers un canal. Nous pouvons observer que les parois du canal sont constituées d'une monocouche cellulaire. Nous observons que les cellules sont rondes, et tassées les unes contre les autres. Ce sont des cellules épithéliales, disposées en colonnes [16]. Ces observations confirment les observations réalisées *in vivo* en microscopie à contraste interférentiel différentiel, qui montrent que les cellules des canaux sont rondes, petites, et accolées les unes contre les autres (paragraphe 3.1.2.2.). La figure 3.15 B montre une coupe radiale à travers un canal et permet d'observer plus en détail la structure des cellules des canaux. Nous pouvons observer la structure des cellules ciliées des canaux : leur noyau, leur cytoplasme, et les coupes de leurs cils.



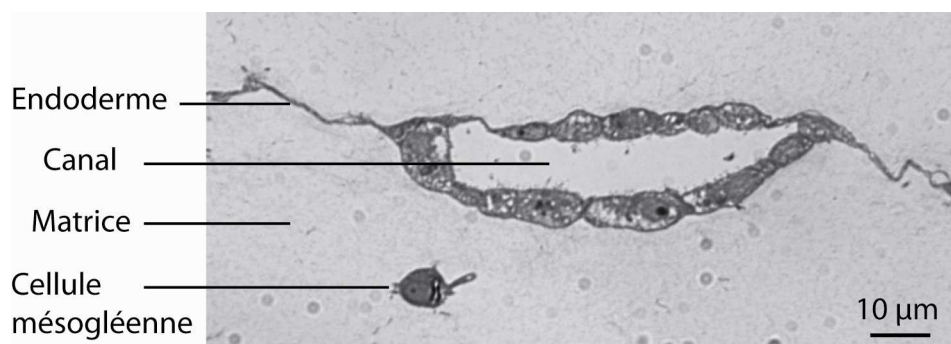


**Figure 3.15** – Visualisation d’une coupe d’un canal par MET. À gauche (A) : vue globale. À droite (B) : vue en détail des cellules de canal.

#### La jonction canal/endoderme au milieu d’un canal en croissance

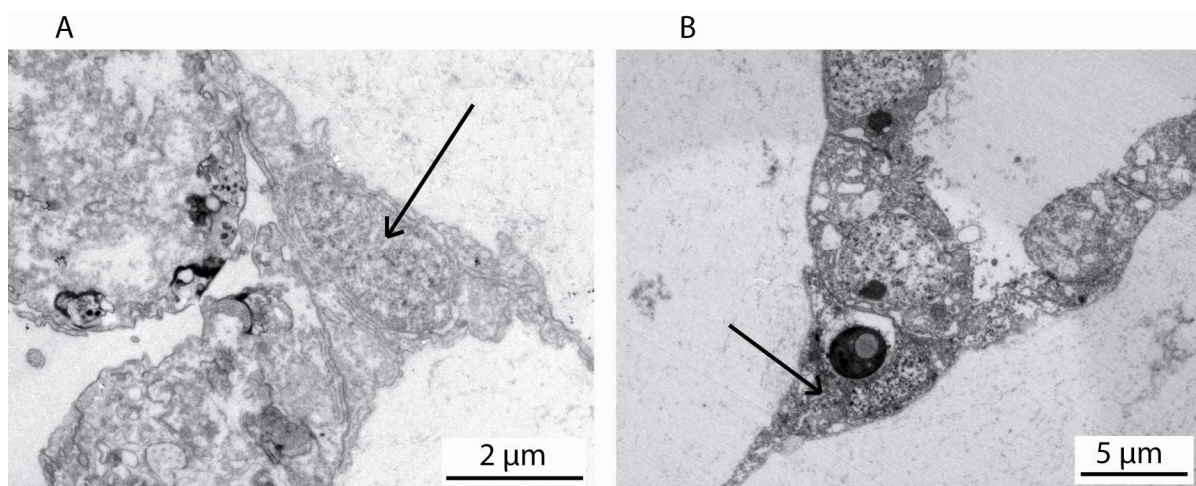
Nous avons réalisé des coupes transversales, permettant de couper un canal dans sa largeur. Certaines de ces coupes ont été réalisées au milieu d’un canal en croissance, loin de son extrémité. Nous nous sommes intéressé au bord du canal, et à sa connexion avec l’endoderme.

La figure 3.16 présente une image d’une coupe transversale d’un canal en croissance, réalisée au milieu de ce canal, et visualisée par microscopie optique (microscope Leica, DMI 3000 B), par un objectif 63X (Leica, PL APO 63X/1.30 GLYC CORR). Le canal, l’endoderme, et une cellule mésoglénne sont clairement visibles. Notons que le canal est plus large que haut. Lors des visualisations des canaux des méduses *in vivo* sous le microscope, nous avons en effet observé que les canaux radiaux, et particulièrement les canaux en croissance, étaient nettement plus larges que hauts. Seul le canal circulaire était de largeur et de hauteur voisines. Des coupes analogues à celle de la figure 3.16 ont été observées au microscope électronique à transmission.



**Figure 3.16** – Visualisation d’une coupe transversale d’un canal en croissance par microscopie optique.

Les figures 3.17 A et B montrent deux jonctions canal/endoderme, loin de l'extrémité du canal en croissance. Dans la figure 3.17 A, le canal est à gauche, et l'endoderme à droite. Dans la figure 3.17 B, le canal est en haut à droite, et l'endoderme en bas à gauche. Dans les deux cas, une cellule de forme 'triangulaire' (indiquée par une flèche sur les figures 3.17 A et 3.19 B) assure la connexion entre canal et endoderme. Cette cellule semble morphologiquement différente des cellules des canaux : elle est plus petite, moins ronde. Elle semble également différente des cellules de l'endoderme : elle n'a pas leur forme plate, et est plus tassée.



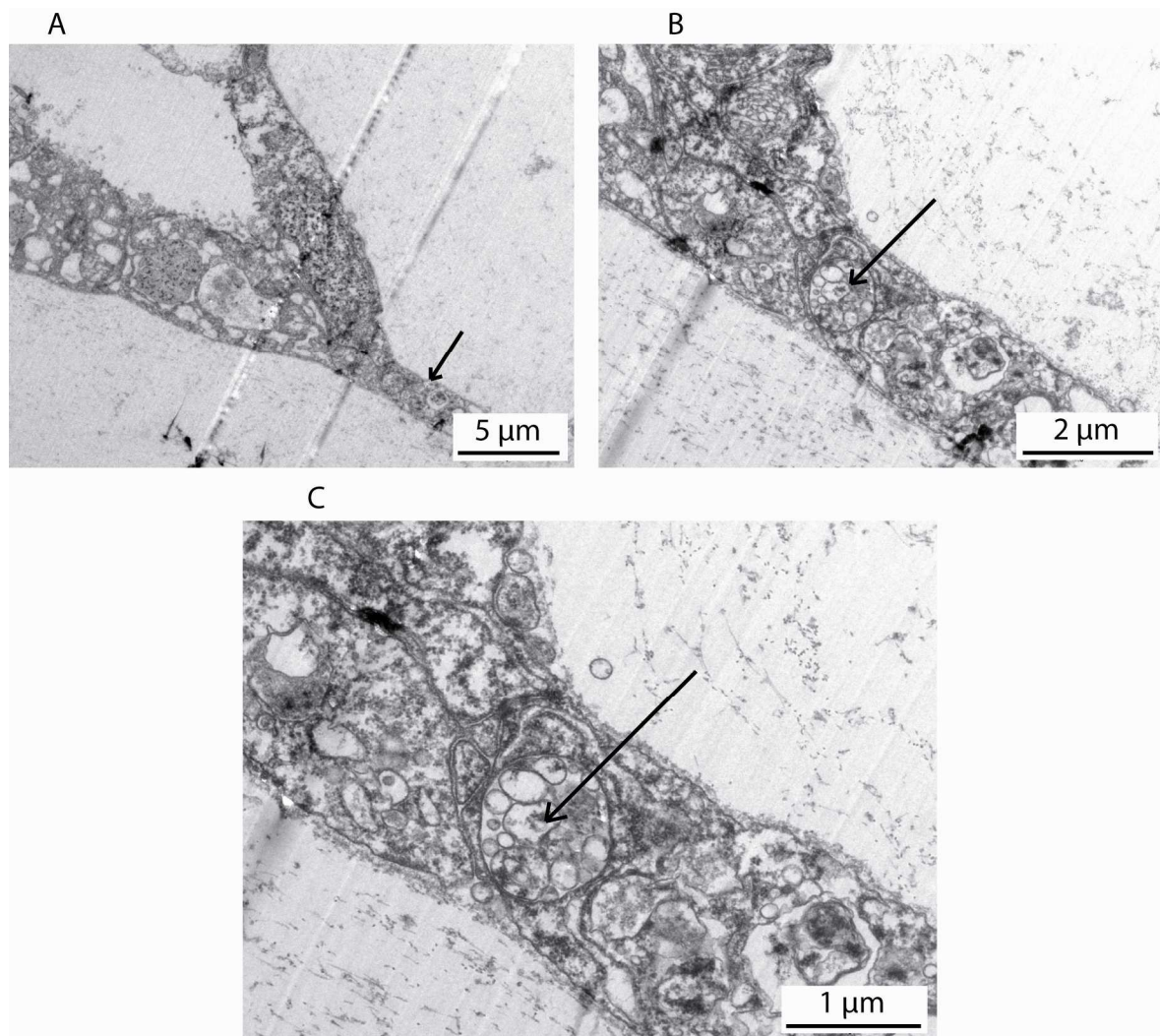
**Figure 3.17** – Visualisations en coupe transversale par MET de la jonction entre un canal en croissance et l'endoderme, loin de l'extrémité du canal. Les flèches indiquent la cellule située à la jonction.

#### La jonction canal/endoderme à l'extrémité d'un canal en croissance

Nous avons également réalisé des coupes transversales, permettant de couper un canal dans sa largeur, à l'extrémité d'un canal en croissance. Nous nous sommes intéressé à la connexion du canal avec l'endoderme, à l'extrémité du canal en croissance. Nous avons par ailleurs réalisé des coupes radiales des canaux en croissance, permettant également de visualiser la jonction canal/endoderme à son extrémité (figure 3.11).

La figure 3.18 présente une image d'une coupe transversale d'un canal en croissance à son extrémité. Les marques parallèles sont ici aussi des artefacts, correspondant à des marques laissées par la lame découpant la résine pour réaliser les coupes. Sur la figure 3.18 A, le canal est en haut à gauche, et sa jonction avec l'endoderme en bas à droite. Les figures 3.18 B et 3.18 C sont des vues en détail de la cellule qui forme la connexion entre le canal et l'endoderme (indiquée par une flèche sur la figure 3.18 A). Nous pouvons observer que cette cellule contient de nombreuses vésicules (indiquées par une flèche sur les figures 3.18 B et

3.18 C). Ces vésicules sont le signe d'une intense activité cellulaire, qui peut être le signe d'une différenciation cellulaire [5]. *A contrario*, la cellule située au niveau de la jonction canal/endoderme loin de l'extrémité d'un canal en croissance ne contient pas ces nombreuses vésicules (figure 3.17).

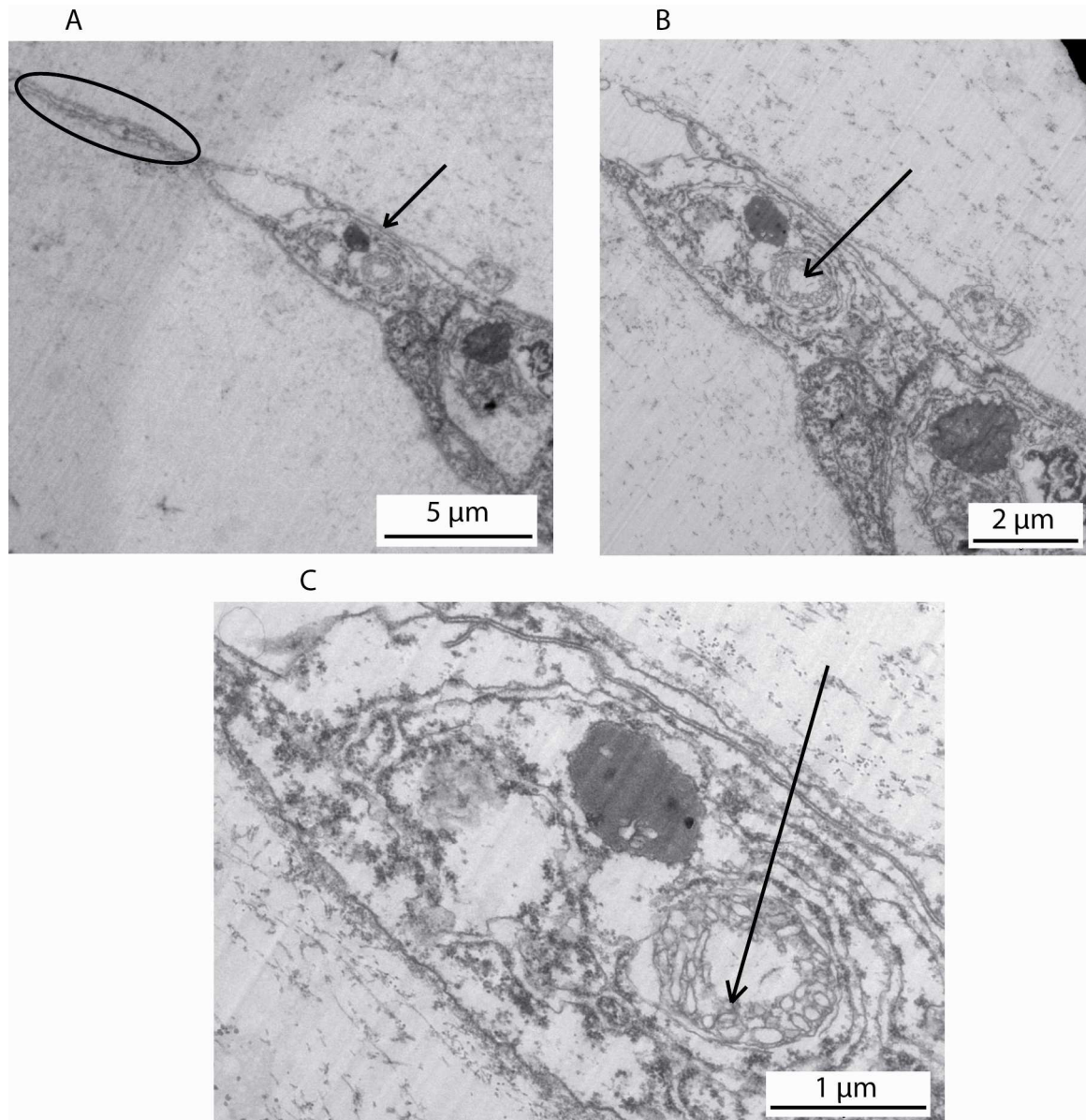


**Figure 3.18** – Visualisation par MET de la jonction entre un canal en croissance et l'endoderme, au niveau de l'extrémité du canal (coupe transversale). Les figures B et C sont des agrandissements progressifs de la figure A. Sur la figure A, les flèches indiquent la cellule située à la jonction. Sur les figures B et C, les flèches indiquent les vésicules contenues dans le cytoplasme de cette cellule.

La figure 3.19 présente une image d'une autre coupe transversale d'un canal en croissance à son extrémité. Les marques parallèles sont là encore des artéfacts, correspondant à des marques laissées par la lame découpant la résine lors des coupes. Sur la figure 3.19 A, l'extrémité de la paroi du canal est en bas à droite, et l'endoderme en haut à gauche. Les figures 3.19 B et 3.19 C sont des vues en détail de la cellule qui forme la connexion entre le



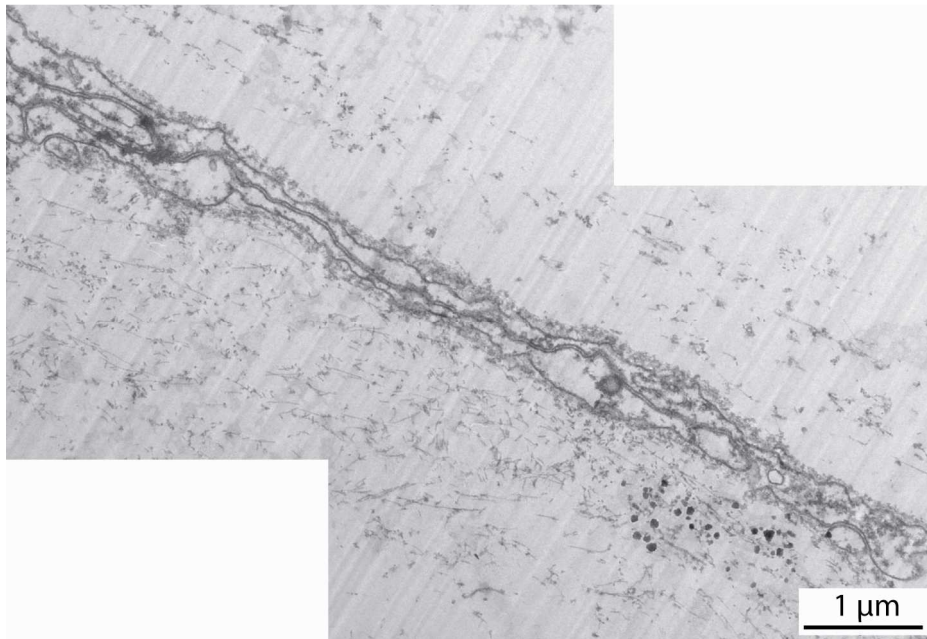
canal et l'endoderme (indiquée par une flèche sur la figure 3.19 A). Nous pouvons là-aussi observer que cette cellule contient de nombreuses vésicules (indiquées par une flèche sur les figures 3.19 B et 3.19 C).



**Figure 3.19** – Visualisation par MET de la jonction entre un canal en croissance et l'endoderme, au niveau de l'extrémité du canal (coupe transversale). Les figures B et C sont des agrandissements progressifs de la figure A. Sur la figure A, les flèches indiquent la cellule située à la jonction. Sur les figures B et C, les flèches indiquent les vésicules contenues dans le cytoplasme de cette cellule.

La figure 3.20 est une reconstitution (à partir de deux images) du détail des cellules de l'endoderme au voisinage d'une connexion entre le canal et l'endoderme (la connexion

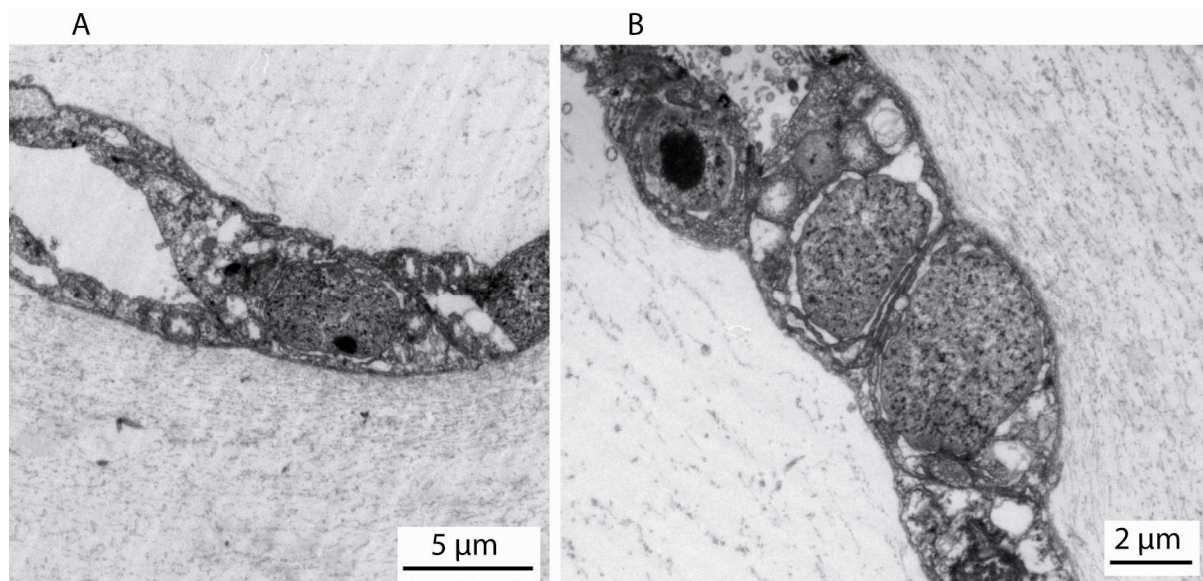
observée sur la figure 3.19). La zone observée est entourée sur la figure 3.19 A. Nous pouvons observer que, comme nous l'avons remarqué précédemment (figure 3.14), au niveau de l'extrémité d'un canal en croissance, les cellules de l'endoderme sont intriquées, empilées et superposées. Ailleurs, les cellules de l'endoderme le sont beaucoup moins, et forment un feuillet cellulaire régulier, d'épaisseur monocellulaire, sauf localement au niveau des jonctions cellulaires (figures 3.12 et 3.13).



**Figure 3.20** – *Visualisation par MET des cellules de l'endoderme au voisinage de l'extrémité du canal en croissance visualisé figure 3.19. Cette image est une vue détaillée de la zone entourée figure 3.19 A.*

Il est intéressant de noter que la membrane basale est clairement visible sur les figures 3.18, 3.19 et 3.20, et qu'elle recouvre de façon continue les cellules des canaux et les cellules de l'endoderme. Il semble qu'au niveau de la jonction canal/endoderme, les cellules de l'endoderme s'empilent les unes sur les autres, et écartent ainsi les deux feuillets de membrane basale situés au-dessus et en-dessous de l'endoderme. Les cellules des canaux, elles, sont recouvertes par la membrane basale côté mésoglée, et non côté lumière du canal.

La figure 3.21 présente des images de coupes radiales réalisées à l'extrémité de canaux en croissance. Sur la figure 3.21 A, le canal est à gauche, et sa jonction avec l'endoderme à droite. Sur la figure 3.21 B, le canal est en haut à gauche, et sa jonction avec l'endoderme en bas à droite. Nous pouvons observer que les cellules situées au niveau des jonctions canal/endoderme sont 'entassées' les unes contre les autres. Cela fait écho à l'empilement et à la superposition des cellules de l'endoderme observés dans les coupes transversales à l'extrémité des canaux en croissance, et décrits précédemment (figures 3.14, 3.19 et 3.20).



**Figure 3.21** – Visualisations par MET de la jonction entre un canal en croissance et l'endoderme, au niveau de l'extrémité du canal (coupe radiale).

Nous avons observé les canaux et l'endoderme par microscopie optique à fluorescence et à contraste interférentiel différentiel, et par microscopie électronique à balayage et à transmission. Les parois des canaux apparaissent comme constituées d'une monocouche de petites cellules rondes, juxtaposées les unes contre les autres. L'endoderme quant à lui, peut être vu comme un pavage des grandes cellules plates, d'épaisseur monocellulaire. Les cellules se lient entre elles en superposant leurs pourtours cytoplasmiques, connectés entre eux par des jonctions serrées. Nous avons également observé que localement, près de l'extrémité d'un canal en croissance, les cellules de l'endoderme sont les unes sur les autres. Les cellules assurant la jonction entre un canal et l'endoderme, à l'extrémité d'un canal en croissance, sont empilées les unes sur les autres et les unes contre les autres, et contiennent de nombreuses vésicules. Ailleurs, une simple cellule, de forme 'triangulaire', assure la jonction entre un canal et l'endoderme.

### 3.2. Croissance des canaux dans l'endoderme

Après avoir visualisé l'organisation cellulaire de l'endoderme, des canaux et des jonctions canal/endoderme de manière statique, nous nous sommes intéressé à la dynamique de croissance des canaux dans l'endoderme, afin de mieux appréhender les processus cellulaires impliqués dans la morphogenèse gastrovasculaire.

Si, comme nous l'avons vu au chapitre 1, plusieurs travaux ont décrit la dynamique du développement du réseau de canaux de la méduse *Aurelia aurita* d'un point de vue macroscopique (direction de croissance, forme du réseau de canaux...) [29,78,133,146], aucun, à notre connaissance, ne s'est intéressé à l'échelle microscopique, et aux processus cellulaires de croissance des canaux dans l'endoderme.

Dans cette partie, nous présenterons tout d'abord nos expériences de suivi *in vivo* de la croissance d'un canal dans l'endoderme. Nous exposerons ensuite les résultats de suivi de l'apparition d'un canal au milieu de l'endoderme. Puis, à la lumière des résultats des différentes expériences, nous proposerons un processus de croissance d'un canal dans l'endoderme. Enfin, nous pointerons quelques aspects du problème qui nous semblent encore non éclaircis, et présenterons des expériences préliminaires par lesquelles nous avons tenté d'éclaircir ces points.

### **3.2.1. Visualisation *in vivo* de la croissance d'un canal**

Nous avons observé chez une méduse juvénile, *in vivo*, la croissance d'un nouveau canal dans l'endoderme. De nombreuses techniques de microscopie (microscopie confocale, 'single plane illumination microscopy', microscopie non linéaire...), associées à des algorithmes de traitement d'images, permettent de suivre *in vivo*, en 3D, et au cours du temps, le développement et la croissance d'un organisme [68,98,114,121,164]. Nous avons essayé de visualiser au cours du temps la croissance des canaux par microscopie à fluorescence, afin de suivre le devenir et le déplacement de chaque cellule, en suivant son noyau. Malheureusement, le marquage cellulaire au DAPI était trop invasif : le DAPI s'insère dans l'ADN des cellules, et les cellules de l'endoderme, particulièrement celles à l'extrémité des canaux en croissance, changeaient d'aspect de manière notable, se rétrécissaient drastiquement, et la croissance des canaux était stoppée. D'autres marqueurs de noyaux, comme le Sytox (Invitrogen, S7020), induisaient les mêmes effets. Par conséquent, nous avons suivi au cours du temps la croissance des canaux dans l'endoderme *in vivo* par microscopie à contraste interférentiel différentiel.

#### **3.2.1.1. Protocole**

Nous sélectionnons une méduse juvénile, d'environ 1 cm de diamètre, et présentant des canaux en croissance. Nous plaçons cette méduse dans la chambre fermée utilisée pour la visualisation des billes des expériences de microrhéologie (chapitre 2, figure 2.14). Cette chambre est fermée sur les parois supérieure et inférieure par des lamelles de verre, afin de permettre l'observation. La méduse est placée sur la lamelle de verre dans la même position que celle utilisée pour les expériences de microrhéologie (chapitre 2, figure 2.14): la méduse est à plat, ombrelle étalée. L'eau autour de la méduse est retirée au maximum, afin de limiter son glissement. L'échantillon est observé par un microscope à contraste interférentiel différentiel (microscope Leica, DMI 3000 B), avec des objectifs grossissant 10X (Leica, PL Fluotar 10X/0.30), 20X (Leica, PL Fluotar 20X/0.40 Corr) et 63X (Leica, PL APO 63X/1.30 GLYC CORR). La chambre ronde, placée sur la platine du microscope, est tournée, afin que le canal en croissance que nous choisissons d'observer soit orienté de haut en bas (la base du

canal en haut, son extrémité en bas). Les images sont acquises par une caméra CCD de haute résolution (Andor, iXon3 885).

Le canal en croissance choisi est suivi au cours du temps. Selon les expériences, il est suivi sur le long terme en étant observé pendant plusieurs jours, une fois par jour, ou bien est suivi sur un temps plus court, en étant visualisé toutes les 30-60 minutes, pendant environ 4 heures. Les images sont prises avec les objectifs grossissant 10X, 20X et 63X. Entre chaque observation et acquisition d'image, la méduse est remise seule dans un des aquariums coniques, où elle nage librement. Par conséquent, avant chaque nouvelle observation, le canal choisi doit être retrouvé (c'est possible, en ayant bien identifié auparavant sa forme et son environnement), puis placé avec la même orientation que pour l'image précédente (base en haut, extrémité en bas).

Notons que la méduse est observée *in vivo*, sans avoir été paralysée, afin que l'expérience soit la moins invasive possible. Les images sont alors acquises entre les battements de la méduse. Cela est possible, dans la mesure où l'éclairement peut être fort et donc le temps d'acquisition de chaque image assez faible (de l'ordre de 100 ms).

Nous avons visualisé la croissance d'un canal chez douze méduses juvéniles. L'interprétation des résultats a été réalisée avec l'aide d'Alexis Peaucelle.

### **3.2.1.2. Résultats**

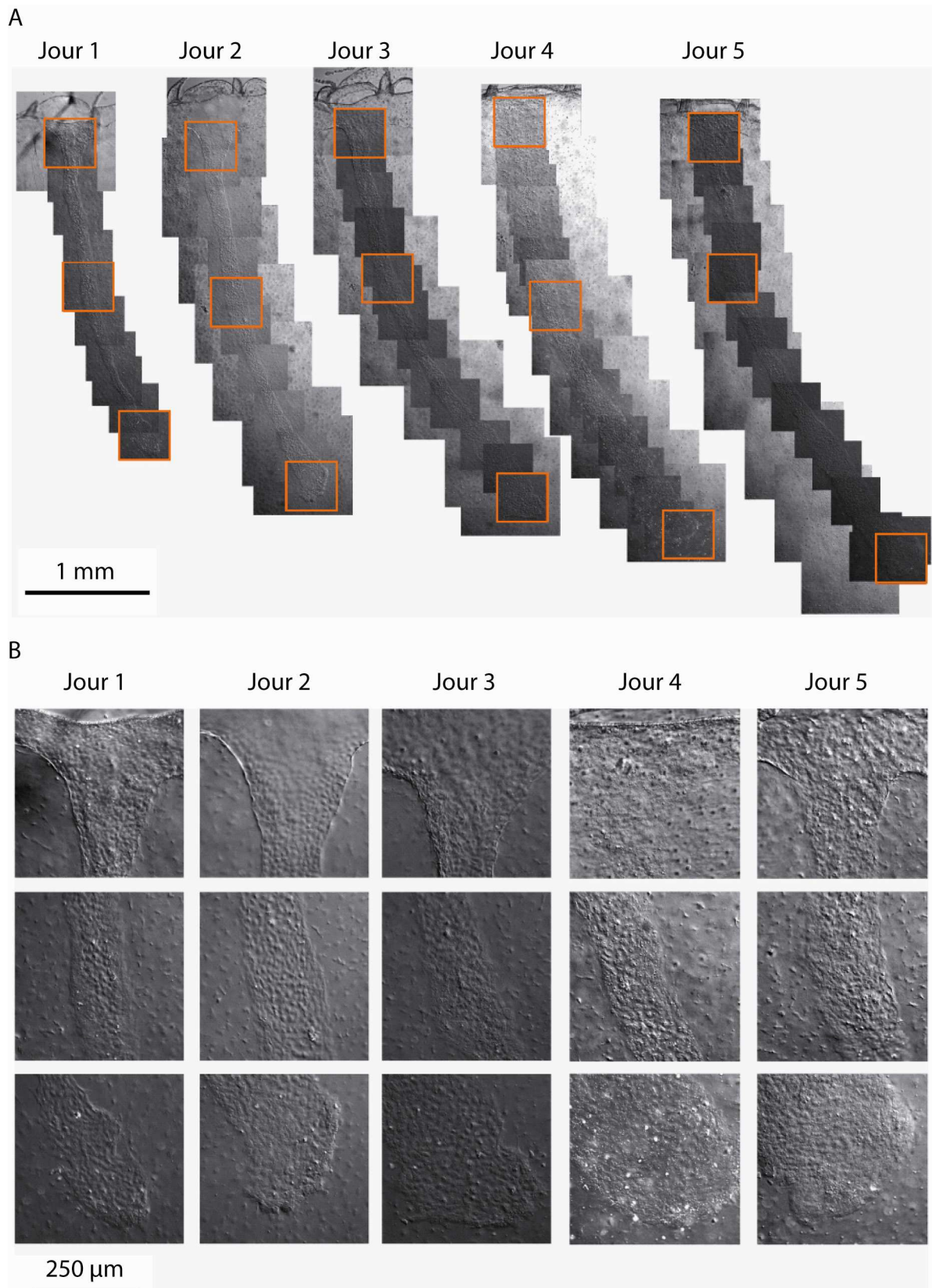
#### Suivi de la croissance pendant plusieurs jours

Nous présentons des observations typiques de suivi *in vivo* de la croissance d'un canal chez une méduse juvénile, pendant cinq jours. Les images sont prises en microscopie à contraste interférentiel différentiel avec les objectifs 10X et 20X.

La figure 3.22 présente le suivi au cours du temps de la croissance d'un canal d'une méduse juvénile. La figure 3.22 A représente les images de la reconstruction globale du canal à partir des images prises avec les objectifs 10X et 20X, chaque jour. La figure 3.22 B représente les images de trois différentes zones du canal, jour après jour. Ces zones sont au niveau de la base du canal, de son milieu, et de son extrémité, et sont entourées en orange sur la figure 3.22 A. L'observation de la figure 3.22 B montre que la base et le milieu du canal évoluent peu au cours du temps. Par contre, son extrémité grandit de manière notable. Ce phénomène a été observé dans tous les canaux en croissance : ils grandissent au niveau de leur extrémité.

Par ailleurs, nous avons pu observer que les canaux en croissance sont assez plats (leur hauteur est bien inférieure à leur largeur), comme l'ont également montré les coupes faites pour les expériences de microscopie électronique à transmission (figure 3.16).

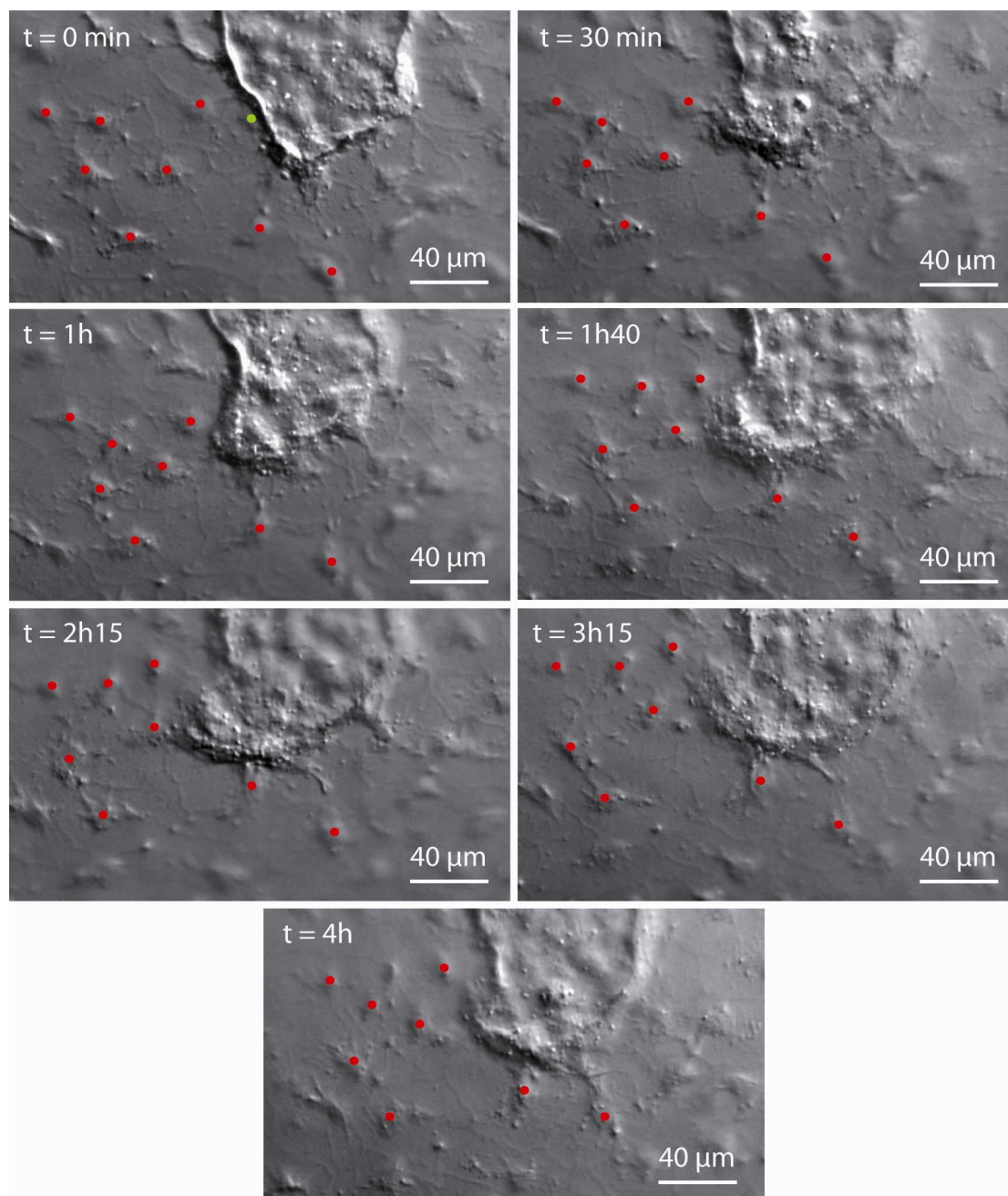




**Figure 3.22** – Visualisation de la croissance d'un canal jour après jour en microscopie à contraste interférentiel différentiel. En haut (A) : vue globale de la croissance du canal. En bas (B) : vue détaillée des différentes zones du canal entourées en orange sur la figure 3.22 A, à savoir les zones à la base, au milieu et à l'extrémité du canal.

### Suivi de la croissance pendant 4 heures

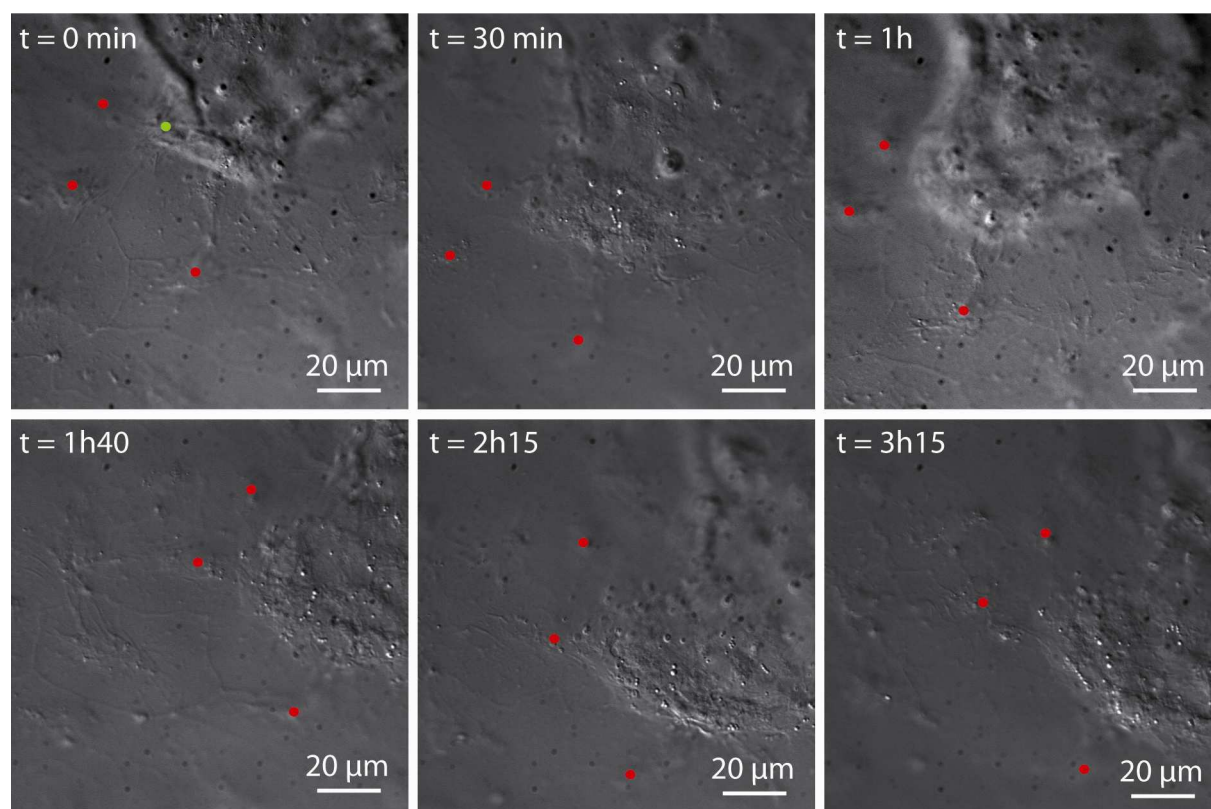
Nous présentons des observations typiques de suivi *in vivo* de la croissance d'un canal chez une méduse juvénile, pendant 4 h. Les images sont prises avec les objectifs 20X et 63X.



**Figure 3.23** – Visualisation de la croissance d'un canal au cours du temps en microscopie à contraste interférentiel différentiel, avec un grossissement 20X.

La figure 3.23 présente le suivi au cours du temps de l'extrémité d'un canal en croissance, observée avec l'objectif 20X. Les noyaux de différentes cellules de l'endoderme sont indiqués par des cercles rouges et vert clair. Nous pouvons observer qu'à  $t = 30$  min, une cellule de l'endoderme (dont le noyau est indiqué par le cercle vert clair à  $t = 0$  min) apparaît comme très grumeleuse. Ces grumeaux disparaissent ensuite, et le noyau de cette cellule n'est alors plus visible, et semble intégré au canal. Ce phénomène semble se reproduire aux temps ultérieurs, impliquant de nouvelles cellules de l'endoderme, bien que les noyaux de celles-ci soient difficilement identifiables.

La figure 3.24 présente le même suivi au cours du temps du canal en croissance, mais observé avec l'objectif 63X. Les détails cellulaires apparaissent plus précisément. Les noyaux de différentes cellules de l'endoderme sont toujours indiqués par des cercles rouges. Nous pouvons observer, à  $t = 30$  min, la cellule de l'endoderme dont le noyau est indiqué par le cercle vert clair à  $t = 0$  min apparaître comme très grumeleuse. Comme observé précédemment, ces grumeaux disparaissent ensuite, et le noyau de cette cellule n'est alors plus visible, et semble intégré au canal.



**Figure 3.24** – Visualisation de la croissance d'un canal au cours du temps en microscopie à contraste interférentiel différentiel, avec un grossissement 63X.

Ces expériences ont montré qu'un canal en croissance grandit au niveau de son extrémité, et que dans cette zone, les cellules de l'endoderme deviennent grumeleuses, puis ne sont plus visibles. Elles sont alors peut-être incorporées au canal en croissance. Ces expériences sont à mettre en rapport avec les expériences de microscopie électronique à transmission, qui



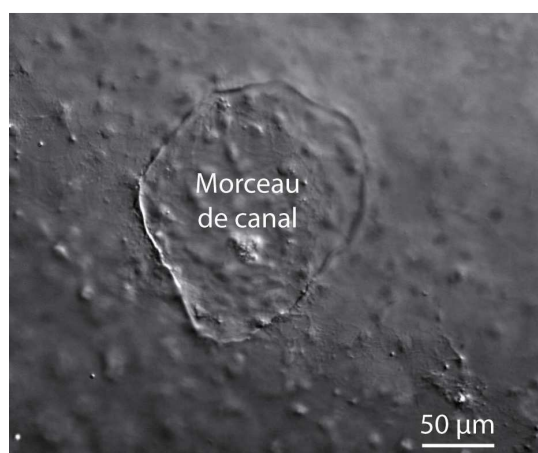
montraient qu'à l'extrémité d'un canal en croissance, au niveau de la jonction avec l'endoderme, les cellules contenaient de nombreuses vésicules. Ces vésicules correspondent vraisemblablement aux grumeaux visibles *in vivo*, par microscopie à contraste interférentiel différentiel.

À ce stade, il semble possible qu'à l'extrémité d'un canal en croissance, les cellules de l'endoderme se différencient en cellules de canal (les vésicules seraient le signe de l'activité cellulaire associée à cette différenciation), ce qui permet la croissance du canal dans l'endoderme [5]. Cependant, il est peut-être également possible qu'à l'extrémité d'un canal en croissance, les cellules de l'endoderme meurent et soient remplacées par des cellules de canal, qui se diviseraient pour prendre leur place (les vésicules seraient alors des lysosomes, associés à un processus d'autophagocytose des cellules de l'endoderme) [5].

### 3.2.2. Visualisation *in vivo* de l'apparition d'un canal au milieu de l'endoderme

Lorsque nous observions les canaux de méduses juvéniles, nous pouvions parfois remarquer des morceaux de canal au milieu de l'endoderme (figure 3.25). Ils ont la même apparence que les canaux décrits précédemment : leur paroi est constituée de petites cellules rondes ciliées. Nous avons cherché à comprendre comment apparaissaient ces canaux au milieu de l'endoderme. Ils peuvent soit provenir d'un canal déjà existant, dont un morceau se serait séparé du reste, soit s'être formés directement au milieu de l'endoderme. Cette dernière hypothèse impliquerait que les cellules de l'endoderme puissent se différencier en cellules de canal. Pour trancher entre ces deux possibilités, nous avons suivi au cours du temps la formation d'un morceau de canal au milieu de l'endoderme.

La figure 3.25 présente un morceau de canal au milieu de l'endoderme, observé en microscopie à contraste interférentiel différentiel chez une méduse juvénile. Nous avons suivi *in vivo* au cours du temps l'apparition et la croissance de ce type de canal, qui apparaît au milieu de l'endoderme, entre des canaux existants.



**Figure 3.25** – Visualisation d'un morceau de canal au milieu de l'endoderme.

### **3.2.2.1. Protocole**

Suite à nos nombreuses observations au microscope de l'endoderme et des canaux de méduses juvéniles, nous avons remarqué que les cellules de l'endoderme pouvaient parfois apparaître localement comme légèrement grumeleuses, et assez proches les unes des autres. Nous nous sommes demandé si dans ces zones apparaissait par la suite un morceau de canal, au milieu de l'endoderme.

Nous sélectionnons une méduse juvénile, d'environ 1 cm de diamètre, et présentant dans l'endoderme une zone où les cellules endodermiques sont proches les unes des autres et légèrement grumeleuses. Cette zone choisie est observée par microscopie à contraste interférentiel différentiel, dans les mêmes conditions que les méduses dont nous avons suivi la croissance des canaux *in vivo* (protocole décrit dans le paragraphe 3.2.1.1.).

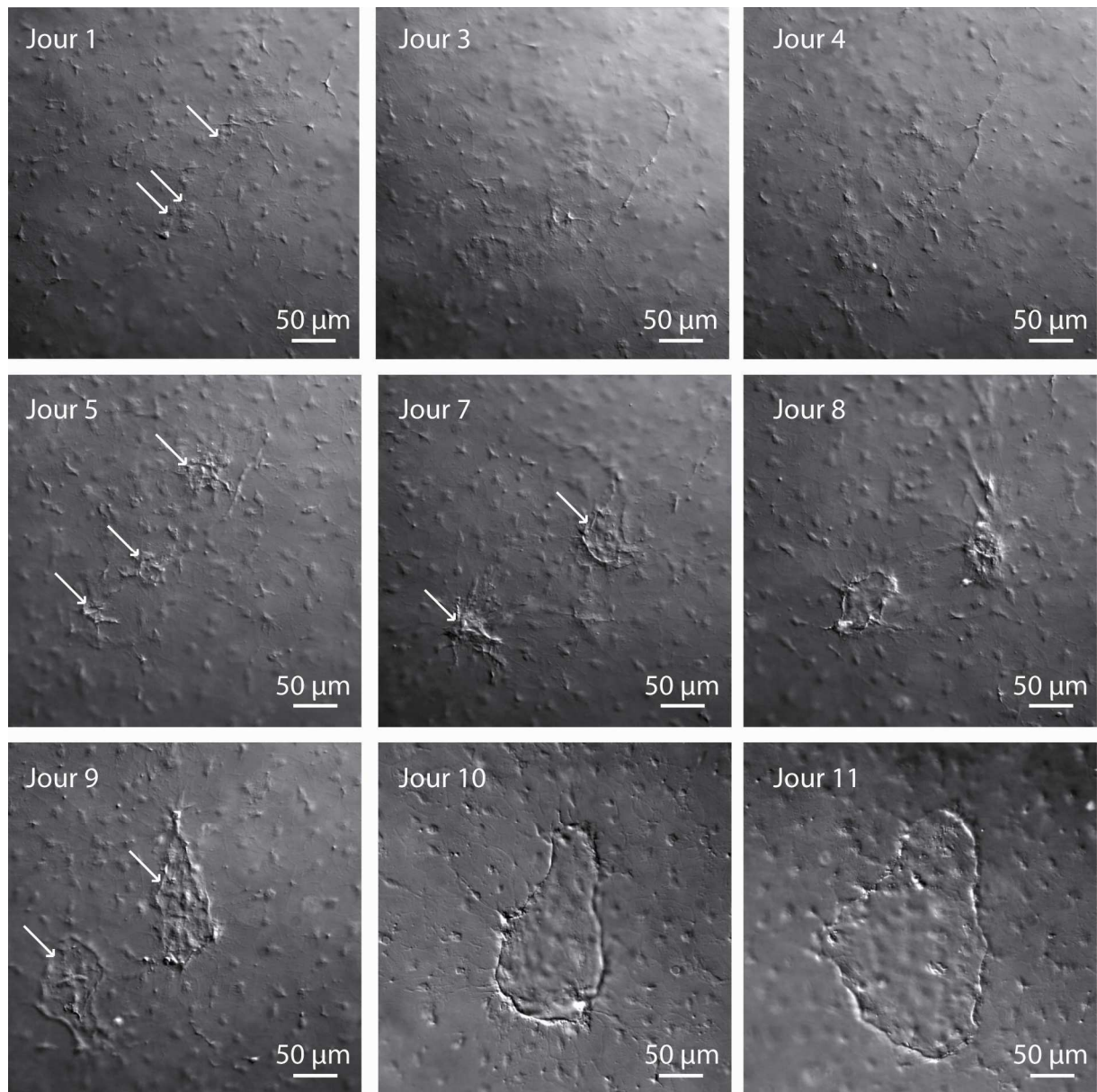
La région de l'endoderme choisie est observée au cours du temps, une image étant prise chaque jour, pendant une dizaine de jours. Entre chaque observation et acquisition d'image, la méduse est mise seule dans un des aquariums coniques, où elle nage librement. Par conséquent, avant chaque nouvelle observation, la région observée doit être retrouvée (c'est possible, en ayant bien identifié auparavant sa forme et son environnement). Les cellules suivies doivent être orientées de la même façon que pour l'image précédente, en tournant la chambre ronde placée sur la platine du microscope.

Nous avons visualisé l'apparition et la croissance d'un canal au milieu de l'endoderme chez douze méduses juvéniles. L'interprétation des résultats a été réalisée avec l'aide d'Alexis Peaucelle.

### **3.2.2.2. Résultats**

Nous présentons un résultat typique de suivi *in vivo* de l'apparition et de la croissance d'un canal chez une méduse juvénile, pendant 10 jours. Les images sont prises *in vivo*, avec les objectifs 20X et 63X.

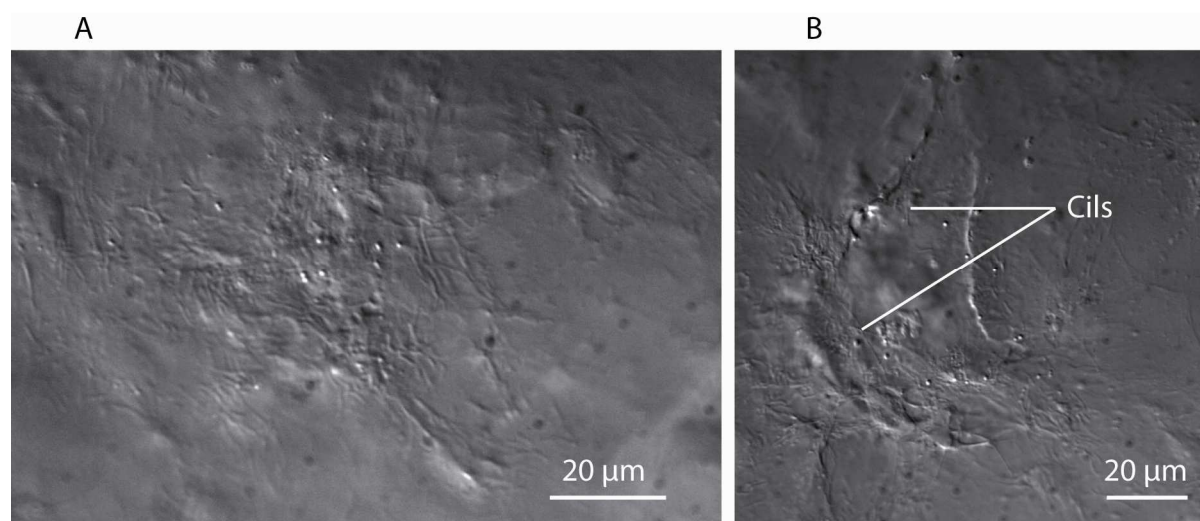
La figure 3.26 présente les images clés d'un suivi au cours du temps d'une zone de l'endoderme où les cellules sont initialement un peu grumeleuses, et assez proches les unes des autres. Nous pouvons observer l'apparition d'un morceau de canal dans cette région de l'endoderme. Les observations sont réalisées *in vivo*, avec l'objectif 20X.



**Figure 3.26** – *Visualisation en microscopie à contraste interférentiel différentiel de l'apparition et de la croissance au cours du temps d'un canal au milieu de l'endoderme.*

Le premier jour, nous observons quelques cellules endodermiques contenant des grumeaux (indiquées par des flèches sur la figure 3.26, jour 1). Les noyaux de ces cellules sont assez proches les uns des autres, ce qui est vraisemblablement le signe que ces cellules doivent être partiellement les unes sur les autres. Le troisième jour et le quatrième jour, ces zones grumeleuses se sont étendues. Le cinquième jour, nous observons d'importants changements morphologiques dans trois régions de la zone observée (indiquées par des flèches sur la figure 3.26, jour 5): les cellules sont grumeleuses et très proches les unes des autres, donnant l'impression d'un épaissement local de l'endoderme. La figure 3.27 A montre une vue de la région supérieure, observée par microscopie à contraste interférentiel différentiel à l'objectif 63X. L'empilement local des cellules est clairement visible, ainsi que l'aspect grumeleux des

cellules. Le septième jour, deux des trois régions ont fusionné, et nous observons deux zones (indiquées par des flèches sur la figure 3.26, jour 7) où les cellules sont densément agglomérées les unes contre les autres. Nous avons observé que la zone supérieure contenait déjà des cellules de canal ciliées clairement identifiables. En effet, des observations de cette zone avec l'objectif 63X nous ont permis de visualiser l'agitation des cils des cellules de canal. La figure 3.27 B montre une vue de cette zone, observée par microscopie à contraste interférentiel différentiel à l'objectif 63X. Les cils sont indiqués sur la figure 3.27 B. Le neuvième jour, nous pouvons distinguer clairement deux morceaux de canal au milieu de l'endoderme (indiqués par des flèches sur la figure 3.26, jour 9). Les cellules des canaux apparaissent plus clairement, et présentent leur morphologie caractéristique : elles sont petites, rondes et ciliées. Le dixième jour, nous observons que les deux morceaux de canal ont fusionné, pour donner un morceau de canal plus grand, au milieu de l'endoderme. Ce morceau de canal continue de grandir, et pourra par la suite se connecter au réseau de canaux existant. Notons qu'il apparaît également que l'endoderme est un tissu extrêmement dynamique : l'agencement des cellules de l'endoderme qui ne se différencient pas et entourent le morceau de canal en formation est en perpétuel changement. Ce changement peut être expliqué par des divisions cellulaires des cellules de l'endoderme, ainsi que des glissements et déplacements de ces cellules, dans le plan de l'endoderme.



**Figure 3.27** – Visualisation en microscopie à contraste interférentiel différentiel de la croissance d'un canal au milieu de l'endoderme. À gauche (A) : vue détaillée d'un épaissement local de l'endoderme visible sur la figure 3.26, le jour 5, dans la zone supérieure de l'image. À droite (B) : vue détaillée des cellules de canal (et de leurs cils) visibles sur la figure 3.26, le jour 7, dans la zone supérieure de l'image.

Ces expériences ont montré qu'un canal pouvait apparaître au milieu de l'endoderme, et que par conséquent les cellules de l'endoderme pouvaient se différencier en cellules de canal. Il est apparu que ce processus est caractérisé par une accumulation locale des cellules de

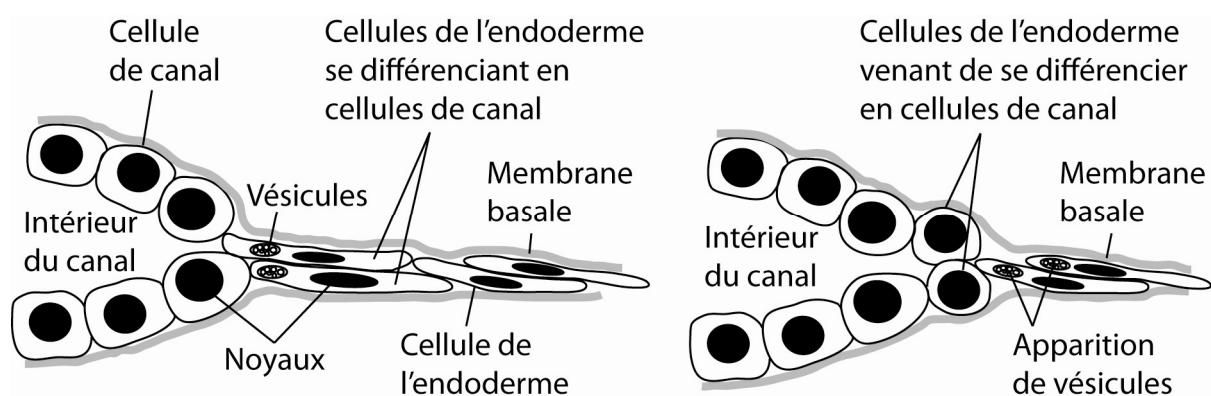
l'endoderme, conduisant à un épaississement local de l'endoderme, et à l'apparition de grumeaux dans ces cellules, correspondant vraisemblablement aux vésicules observées en MET.

### 3.2.3. Processus de croissance d'un canal dans l'endoderme

À la lumière des différentes expériences menées (observation *in vivo* de l'endoderme, des canaux, de l'apparition et de la croissance des canaux et des coupes de ces structures en microscopie électronique), nous pouvons proposer un processus de croissance cohérent d'un canal dans l'endoderme.

Comme nous l'avons vu au chapitre 1, les canaux grandissent dans l'endoderme plus rapidement que la croissance globale de la méduse. Nous avons montré qu'un canal en croissance grandit au niveau de son extrémité (expériences de suivi *in vivo* de la croissance d'un canal). À cet endroit, les cellules de l'endoderme s'accumulent et 'montent les unes sur les autres' (expériences de MET et de suivi de l'apparition d'un canal au milieu de l'endoderme). Conjointement, le cytoplasme de ces cellules se remplit de vésicules, qui signalent la différenciation des cellules de l'endoderme en cellules de canal (expériences de MET et de suivi de l'apparition d'un canal au milieu de l'endoderme). Par ce processus, le canal peut croître progressivement dans l'endoderme. Notons que l'accumulation locale des cellules de l'endoderme permet de passer d'une monocouche cellulaire (structure de l'endoderme loin des zones de croissance des canaux) à une multicouche cellulaire, indispensable à la formation de la structure tubulaire des canaux.

La figure 3.28 présente un schéma du processus de croissance d'un canal dans l'endoderme.



**Figure 3.28** – Schéma de la croissance d'un canal dans l'endoderme. Pour plus de clarté, les dimensions ne sont pas respectées.



### 3.2.4. Divisions cellulaires

Si les processus de croissance d'un canal dans l'endoderme apparaissent à présent de façon plus claire, nous n'avons pas éclairci comment une région de l'endoderme, contenant au départ peu de cellules, pouvait être remplacée par un canal, contenant de nombreuses cellules. Il apparaît dès lors pertinent de nous intéresser aux divisions cellulaires, qui semblent indispensables à la croissance d'un canal dans l'endoderme.

Les images de canaux et d'endoderme réalisées *in vivo* au microscope (figure 3.2) montrent clairement que la densité cellulaire est bien plus importante dans un canal que dans l'endoderme. Une estimation rapide permet d'évaluer le nombre de cellules par unité de surface dans l'endoderme à 900 cellules/mm<sup>2</sup> et dans un canal à 7000 cellules/mm<sup>2</sup>. Ainsi, des divisions cellulaires sont indispensables à la croissance d'un canal dans l'endoderme. Les cellules de l'endoderme se différenciant en cellules de canaux, il est possible qu'elles soient des cellules souches, qui sont capables de se diviser indéfiniment, et dont certaines des cellules filles peuvent se différencier, afin de former un organe [5]. Dès lors, il est possible qu'à l'extrémité d'un canal en croissance, les cellules de l'endoderme se divisent, s'accumulent les unes sur les autres, et se différencient en cellules de canal. Il est également envisageable que les cellules de l'endoderme migrent et s'accumulent localement à l'extrémité d'un canal en croissance, se différencient en cellules de canaux, et que parallèlement les cellules de canaux se divisent. Un troisième scénario, somme des deux précédents, est qu'à l'extrémité d'un canal en croissance, les cellules de l'endoderme se divisent, s'accumulent, se différencient en cellules de canaux, et que ces dernières se divisent également par la suite.

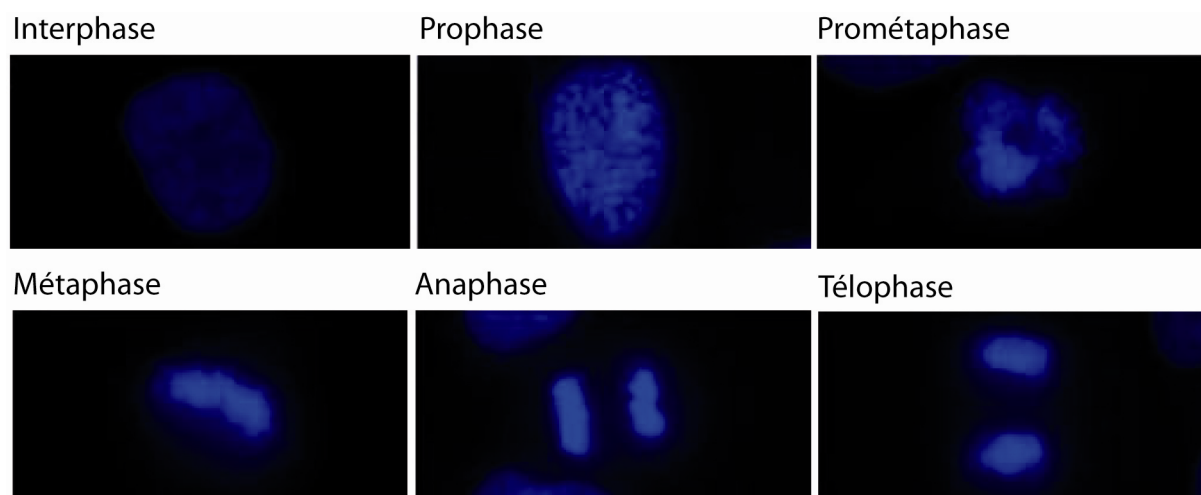
Notons qu'indépendamment du processus de croissance d'un canal dans l'endoderme, les cellules des canaux et de l'endoderme sont *a priori* capables de se diviser, afin de permettre la croissance globale de la méduse.

Afin de déterminer si, à l'extrémité d'un canal en croissance, les cellules de l'endoderme, en sus de se différencier, se divisent, nous avons cherché à visualiser et à compter les divisions cellulaires en marquant les noyaux des cellules au DAPI. Ces expériences ont été réalisées par Muriel Tyrman, dans le cadre de son stage de recherche de M1, effectué dans notre équipe.

#### 3.2.4.1. Protocole

Comme nous l'avons mentionné au paragraphe 3.1.1.1., le DAPI est un intercalant d'ADN, qui absorbe l'UV et réémet une fluorescence bleue, ce qui permet de détecter l'ADN des cellules par microscopie à fluorescence. Le marquage au DAPI permet non seulement de visualiser les noyaux cellulaires, mais également de déterminer si une cellule est en division, et à quelle phase de la mitose elle se situe. La figure 3.29, extraite de Dellaire et al. [41], est une succession d'images des différentes étapes du cycle cellulaire, et notamment de la mitose,

visualisées *in vitro*, par marquage au DAPI. Notons que le DAPI, parce qu'il perturbe l'activité cellulaire, bloque les cellules en division dans la phase dans laquelle elles sont au moment de l'immersion de l'animal dans le DAPI.

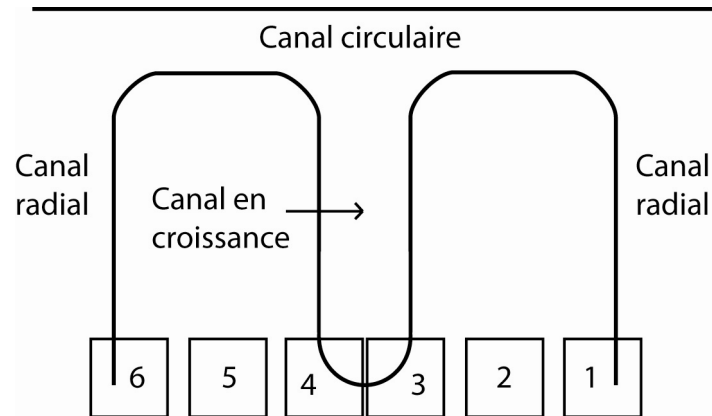


**Figure 3.29** – Principales étapes du cycle cellulaire, et notamment de la mitose, de cellules humaines (HeLa cells) marquées au DAPI et observées *in vitro*. Figure extraite de Dellaire et al. [41].

Les noyaux des cellules d'une méduse juvénile possédant des canaux en croissance sont marqués au DAPI, observés au microscope à fluorescence avec l'objectif à immersion grossissant 63X, et visualisées par la caméra CCD de haute résolution, dans les mêmes conditions que les méduses dont nous avons visualisé l'endoderme *in vivo* (protocole décrit dans le paragraphe 3.1.1.1.).

Nous visualisons les cellules de l'endoderme à l'extrémité d'un canal en croissance, et de part et d'autre de ce canal, dans des zones situées à distances égales du bord de l'ombrelle (figure 3.30). Nous comptons le nombre de cellules et le nombre de cellules en division dans chaque zone (zones 1 et 6, près des canaux radiaux, zones 2 et 5, au milieu de l'endoderme, et zones 3 et 4 à l'extrémité du canal en croissance). Nous calculons dans chaque zone l'index mitotique (IM), à savoir le rapport, exprimé en pourcentage, entre le nombre de cellules en division ( $C_{div}$ ) et le nombre de cellules total ( $C_{tot}$ ) :  $IM = \frac{C_{div}}{C_{tot}} \times 100$  [87]. Si l'index mitotique est plus grand dans les zones 3 et 4 que dans les autres zones, cela signifiera que les cellules de l'endoderme se divisent plus fréquemment à l'extrémité d'un canal en croissance, et donc que ces cellules non seulement se différencient, mais se divisent également, afin de permettre la croissance du canal. Notons que les différentes zones sont à distances égales du bord de l'ombrelle, afin d'éviter tout artéfact correspondant à la croissance de la méduse. En effet, la croissance de l'ombrelle de la méduse doit être associée à un taux de divisions cellulaires plus important sur le bord de l'ombrelle qu'au centre. Ainsi, pour ne prendre en compte que le paramètre 'croissance d'un canal', les index mitotiques doivent être calculés dans des zones

situées à des distances au bord de l'ombrelle égales. Les expériences ont permis de visualiser 30 canaux en croissance, chez 13 méduses. L'interprétation des résultats a été réalisée avec l'aide d'Alexis Peaucelle.

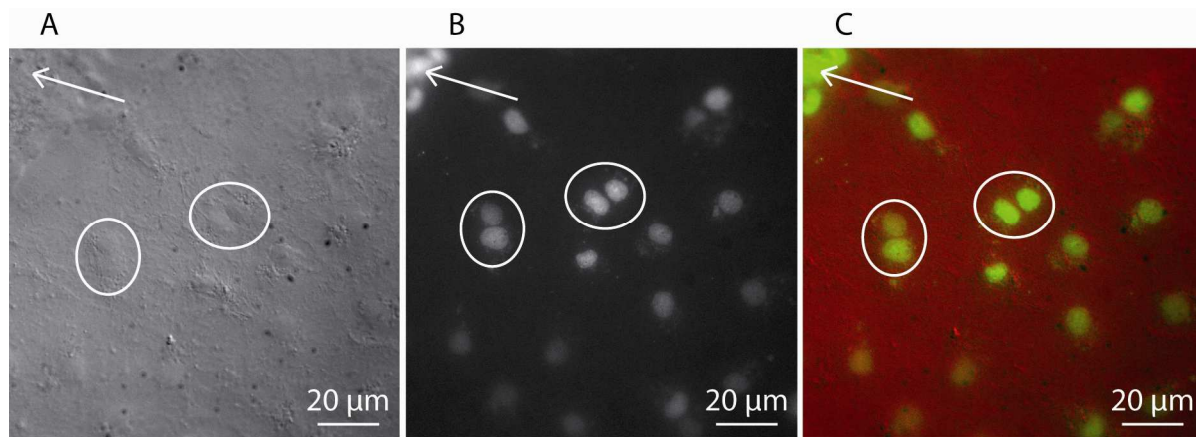


**Figure 3.30** – Zones visualisées pour le calcul de l'index mitotique dans l'endoderme.

#### 3.2.4.2. Résultats

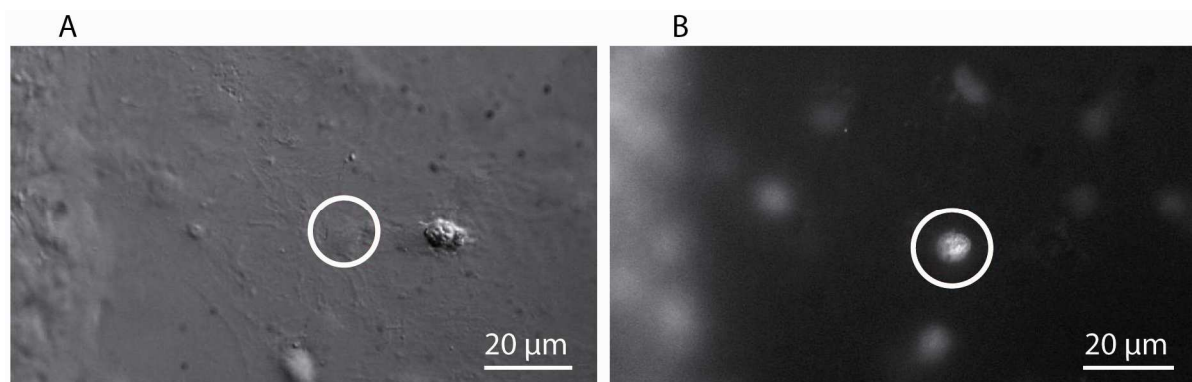
Autour de chaque canal en croissance, chaque zone de l'endoderme a été visualisée deux fois : en microscopie à contraste interférentiel différentiel, et en fluorescence. Les noyaux des cellules sont visibles sur les deux types d'images, ce qui permet de vérifier que les noyaux observés sont bien situés dans l'endoderme, et pas dans la matrice (ils pourraient être alors confondus avec les noyaux des cellules mésogléennes).

La figure 3.31 présente une zone de l'endoderme dans la zone 3, vue à gauche en microscopie à contraste interférentiel différentiel (figure 3.31 A) et au milieu en fluorescence (figure 3.31 B). La figure 3.31 C correspond à une combinaison de ces deux images. L'extrémité du canal est en haut à gauche (indiqué par une flèche sur les figures 3.31 A, B et C). Nous pouvons remarquer que certains noyaux sont très proches les uns des autres (entourés par un cercle sur les figures 3.31 A, B et C). Ces noyaux proches ont été principalement observés aux extrémités des canaux (ce point sera détaillé par la suite).



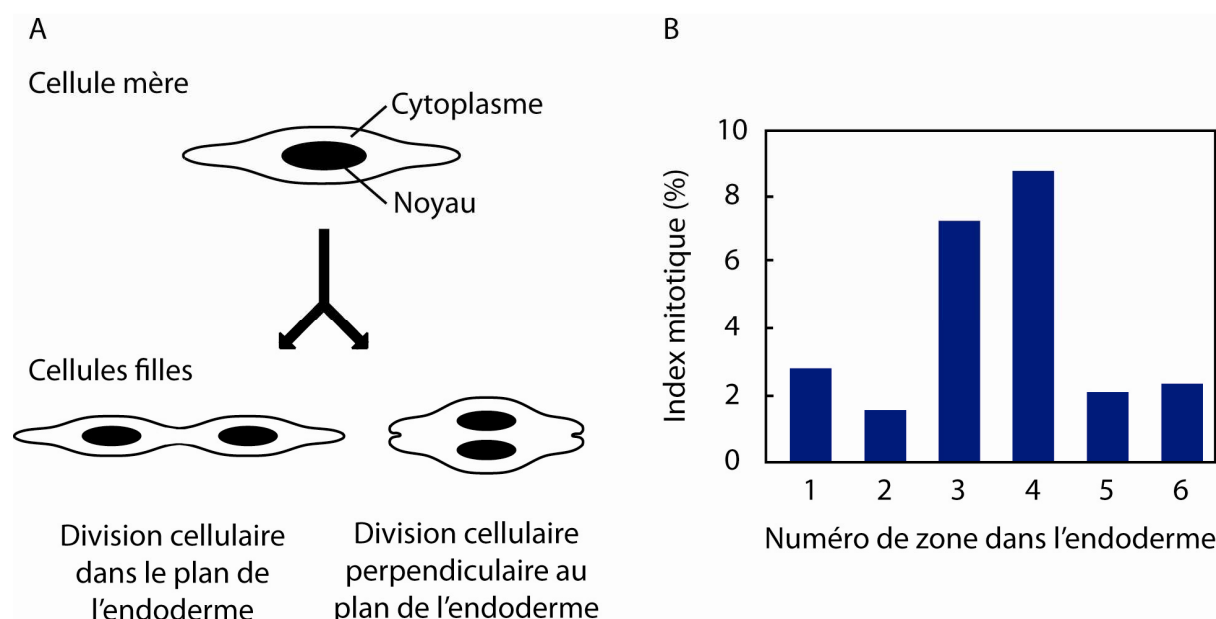
**Figure 3.31** – Visualisation de l’endoderme dans la zone 3. À gauche (A) : en microscopie à contraste interférentiel différentiel. Au milieu (B) : en microscopie à fluorescence. À droite (C) : images A et B combinées, l’image A étant en rouge et la B en vert. Les flèches indiquent l’extrémité du canal. Les paires de cellules de l’endoderme sont entourées.

Malheureusement, dans aucun des noyaux observés (sur les 1234 noyaux visualisés), nous n’avons observé les condensations d’ADN caractéristiques des étapes de la mitose (figure 3.29). Plus exactement, nous n’avons observé qu’un noyau chez lequel nous pouvions deviner un début d’anaphase (figure 3.32). L’anaphase est l’étape de séparation des chromatides. Les deux ‘traits’ brillants sont d’épaisseurs différentes, ce qui peut être le signe que la mitose n’a pas lieu dans le plan de l’endoderme, mais de biais. Ces observations suggèrent que les divisions cellulaires des cellules endodermiques ont peut-être lieu perpendiculairement à l’endoderme (et parfois légèrement de biais), et non dans le plan de l’endoderme (figure 3.33 A). Dans ce cas, comme nous ne pouvons voir *in vivo* l’endoderme que dans son plan, il ne serait pas possible de voir les différentes étapes de la mitose. Nous ne pourrions voir que les deux cellules filles, dans la mesure où celles-ci glisseraient légèrement l’une sur l’autre (leur noyaux ne seraient alors plus superposés).



**Figure 3.32** – Visualisation de l’endoderme dans la zone 3. À gauche (A) : en microscopie à contraste interférentiel différentiel. À droite (B) : en microscopie à fluorescence. Une cellule de l’endoderme qui semble en anaphase est entourée.

Par conséquent, nous avons considéré que les paires de noyaux proches correspondaient à des cellules venant de se diviser, et les avons comptées. Nous avons calculé l'index mitotique d'une zone donnée, en faisant le rapport entre le nombre de cellules venant de se diviser dans cette zone (tous canaux confondus), et le nombre total de cellules observées dans cette zone (tous canaux confondus). Les index mitotiques sont exprimés en pourcentage. La figure 3.33 B montre l'index mitotique en fonction de la zone observée. Nous observons qu'il est plus important dans les zones 3 et 4, correspondant à l'extrémité d'un canal en croissance.



**Figure 3.33** – *Division cellulaire et index mitotique dans l'endoderme. À gauche (A) : schéma des différentes directions de plans de division cellulaires. À droite (B) : index mitotique en fonction de la zone observée de l'endoderme.*

Ceci montre que le nombre de cellules de l'endoderme proches est plus important à l'extrémité d'un canal en croissance qu'ailleurs. Cela peut éventuellement correspondre à un nombre plus important de divisions cellulaires, mais sans certitude. Il reste en effet tout à fait possible que les paires de cellules proches ne soient pas le résultat de divisions cellulaires, mais soient des cellules qui ont glissé l'une sur l'autre. Il faudrait pouvoir confirmer que les cellules de l'endoderme se divisent perpendiculairement au plan de l'endoderme, en visualisant au cours du temps une division cellulaire au microscope à fluorescence, ou en visualisant une division cellulaire en coupe au microscope électronique à transmission. Ces expériences sont très techniques, et nous n'avons malheureusement pas eu le temps de les réaliser. Il serait également intéressant de mesurer les index mitotiques des canaux, afin de déterminer si les divisions cellulaires sont plus nombreuses dans un canal en croissance, et

notamment à son extrémité. Si tel est le cas, les divisions cellulaires nécessaires à la croissance d'un canal dans l'endoderme seraient en partie assurées par les cellules des canaux.

### **3.3. Conclusion**

Les expériences de visualisation par microscopie optique à fluorescence et à contraste interférentiel différentiel, et par microscopie électronique à balayage et à transmission, nous ont permis de déterminer la structure de l'endoderme, des canaux, ainsi que de leur jonction. Ces observations ont été mises en perspective avec les résultats des expériences de suivi de la croissance d'un canal dans l'endoderme et de l'apparition d'un canal au milieu de l'endoderme. Nous avons alors pu proposer un processus cohérent de croissance d'un canal dans l'endoderme : un canal croît au niveau de son extrémité, par accumulation locale des cellules de l'endoderme et différenciation de ces cellules en cellules de canal. Par unité de surface, les cellules de canal étant beaucoup plus nombreuses que les cellules de l'endoderme, le processus de différenciation est sans doute accompagné de divisions cellulaires. Nos expériences de visualisation des noyaux de l'endoderme marqués au DAPI montrent un nombre de paires de noyaux plus important à l'extrémité d'un canal en croissance. Ainsi, si les cellules de l'endoderme se divisent, les divisions doivent avoir lieu perpendiculairement au plan de l'endoderme. Il est également possible que les divisions cellulaires nécessaires à la croissance d'un canal dans l'endoderme soient assurées par les cellules des canaux.

Quoi qu'il en soit, un canal croît au niveau de son extrémité, par accumulation locale des cellules de l'endoderme et différenciation de ces cellules en cellules de canal. Dès lors, déterminer l'orientation de la croissance d'un canal revient à déterminer quelles zones de l'endoderme, à l'extrémité d'un canal en croissance, se différencient en cellules de canal.

Dans le chapitre suivant, nous chercherons à comprendre quels processus permettent de déterminer quelles cellules de l'endoderme se différencieront en cellules de canal. Nous nous intéresserons notamment au rôle joué par les contraintes mécaniques induites par les contractions musculaires.

## 4. Rôle des contractions musculaires dans la croissance des canaux

Comme nous l'avons vu dans le chapitre 3, un canal croît dans l'endoderme au niveau de son extrémité, par accumulation locale des cellules de l'endoderme et différenciation de ces cellules en cellules de canal. Ainsi, l'orientation de la croissance d'un canal est déterminée par la localisation des cellules de l'endoderme, qui, à l'extrémité d'un canal en croissance, se différencient en cellules de canal.

Dans ce chapitre, nous exposons les expériences réalisées nous permettant d'appréhender quels processus permettent de déterminer quelles cellules de l'endoderme se différencieront en cellules de canal. Nous nous sommes tout particulièrement intéressé au rôle joué par les contraintes mécaniques induites par les contractions musculaires.

Dans une première partie, nous présenterons la structure des muscles et la réponse mécanique des tissus de la méduse aux contractions musculaires. Dans une seconde, nous exposerons un modèle par éléments finis permettant de visualiser la répartition des contraintes dans l'endoderme, suite à une contraction musculaire. Enfin, nous présenterons les résultats d'une expérience que nous avons montée, permettant d'appliquer de manière externe des contraintes dans l'endoderme.

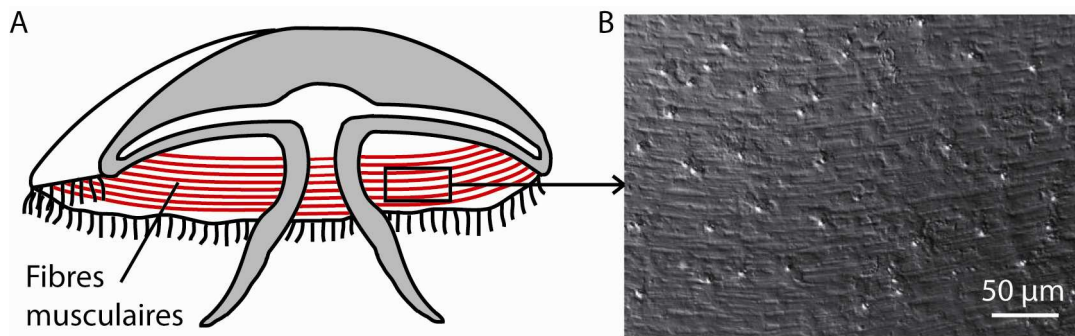
### 4.1. Des tissus soumis à des contraintes musculaires

#### 4.1.1. Structure des muscles et contractions musculaires

Comme nous l'avons introduit au chapitre 1 (paragraphe 1.2.3.), la méduse *Aurelia aurita* nage par hydropropulsion, en contractant régulièrement ses muscles [38,60]. Les contractions sont périodiques, avec une fréquence de l'ordre de un battement toutes les deux secondes [132]. Des cellules épithéliomusculaires, situées au niveau de l'épiderme de la sous-ombrelle, forment les fibres musculaires (chapitre 1, figure 1.4) [8]. Ces dernières permettent de constituer une large bande musculaire annulaire, située à la périphérie de la sous-ombrelle (figure 4.1 A) [16,65]. La structure striée des muscles peut facilement être visualisée *in vivo* par microscopie à contraste interférentiel différentiel (figure 4.1 B).

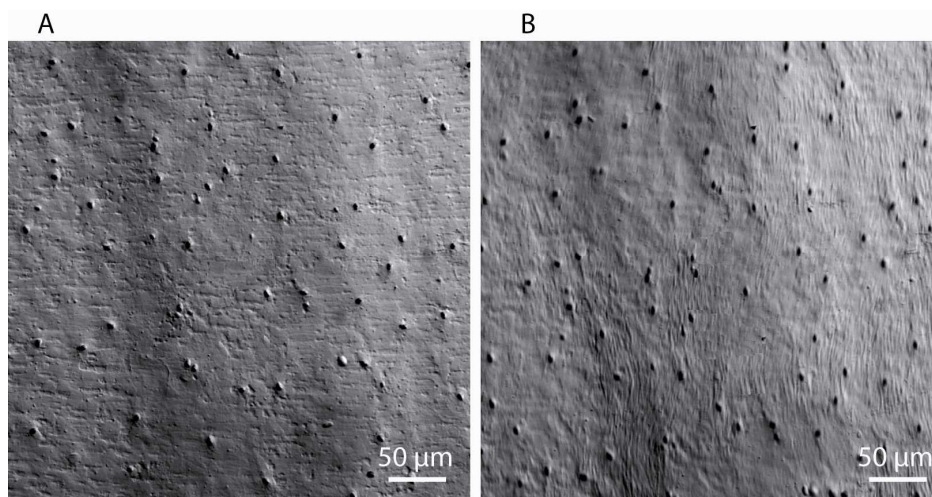
Afin que les fibres musculaires se contractent simultanément, un système de cellules nerveuses coordonne l'action des cellules épithéliomusculaires [66]. Ces cellules nerveuses sont des neurones bipolaires qui forment un réseau parcourant toute la surface de la sous-ombrelle et circulant entre les cellules épithéliomusculaires [8,65].





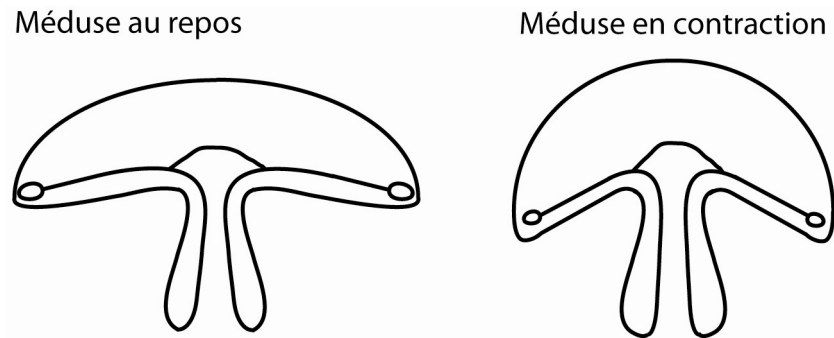
**Figure 4.1** – *Fibres musculaires.* À gauche (A) : schéma de la disposition des fibres musculaires. À droite (B) : détail des fibres musculaires visualisées en microscopie à contraste interférentiel différentiel, avec l'objectif 20X.

Les contractions musculaires sont annulaires : à chaque contraction, les fibres musculaires, qui font le tour de l'ombrelle, se compriment (figure 4.2). La sous-ombrelle, parcourue par la bande musculaire sur son pourtour extérieur, voit alors sa surface diminuer : nous avons observé en visualisant une méduse juvénile sous la loupe binoculaire (Leica, Z16 APO) que lors d'une contraction musculaire, le diamètre de l'ombrelle de la méduse est réduit de l'ordre de dix pourcents. En conséquence, la 'cloche' formée par l'ombrelle se creuse, et la méduse est propulsée en avant (figure 4.3) [38,60,106]. Comme nous l'avons décrit dans le chapitre 2 (paragraphes 2.1.2. et 2.5.2.), chaque contraction musculaire comprime et déforme la mésoglée. L'élasticité de cette dernière permet à la méduse de retrouver sa forme initiale après chaque contraction [26,60,106].



**Figure 4.2** – *Fibres musculaires au repos et en contraction visualisées en microscopie à contraste interférentiel différentiel, avec l'objectif 20X.* À gauche (A) : visualisation des fibres musculaires au repos. À droite (B) : visualisation, dans la même région, des fibres musculaires en contraction.





**Figure 4.3** – *Schéma d'une méduse au repos et en contraction.*

Chaque contraction musculaire comprime et déforme tous les tissus de la méduse, non seulement la mésoglée, mais aussi les canaux et l'endoderme. Le lien entre les contraintes appliquées par les muscles et les déformations des tissus est décrit par les propriétés viscoélastiques de ces derniers. Dans le paragraphe suivant, nous présenterons les propriétés mécaniques de l'endoderme inséré dans la mésoglée. Puis, nous décrirons nos observations des déformations des tissus observables lors des contractions musculaires.

#### **4.1.2. Propriétés viscoélastiques des tissus**

Si les propriétés mécaniques de la mésoglée ont été mesurées localement quantitativement par des expériences de microrhéologie, nous avons évalué qualitativement les propriétés mécaniques de l'endoderme. Mesurer ses propriétés viscoélastiques de manière quantitative semblait techniquement très difficile. Nous avons en effet essayé de les mesurer grâce au rhéomètre cellulaire développé par Atef Asnacios [43,44,107,108], mais nous avons été arrêtées par de nombreuses difficultés : la lame supérieure du rhéomètre s'enfonçait difficilement dans la méduse, et emportait avec elle des cellules de l'ectoderme dans la mésoglée, et la méduse glissait beaucoup. Nous avons également pensé à attacher des billes à l'endoderme, et à les manipuler par des pinces optiques ou magnétiques, développées par Sylvie Hénon [7,71]; mais nous aurions souhaité appliquer une force verticale, perpendiculairement à l'endoderme, pour tirer ou appuyer sur ce dernier, et ces techniques permettent d'appliquer des forces seulement horizontalement, donc dans le plan de l'endoderme. Cependant, comme nous le verrons par la suite, il est apparu que la connaissance des valeurs exactes des modules viscoélastiques de l'endoderme ne fut pas indispensable à la suite de notre travail.

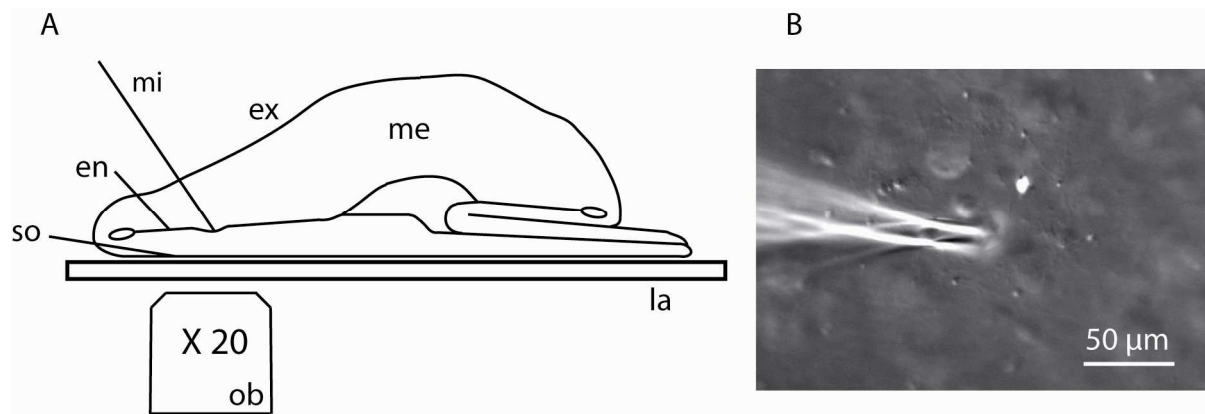
#### **4.1.2.1. L'endoderme**

Différentes expériences simples nous ont permis d'avoir une représentation qualitative des propriétés physiques de l'endoderme. Ces expériences ont été proposées lors des discussions que nous avons eues avec Ken Sekimoto.

Nous avons pu dans un premier temps mesurer qualitativement les propriétés mécaniques de l'endoderme en insérant une micropipette dans la mésoglée d'une méduse juvénile, puis en appuyant délicatement sur l'endoderme et en visualisant au microscope sa déformation. Les micropipettes utilisées sont identiques à celles employées pour l'injection de microbilles dans la mésoglée pour les expériences de microrhéologie (chapitre 2, paragraphe 2.4.2.1.). Elles ont une extrémité d'une taille de quelques microns, et sont fabriquées au laboratoire, en étirant un capillaire en verre borosilicate, de diamètre externe 1 mm et interne 0.58 mm (Harvard Apparatus, réf GC100-15), au moyen d'un étireur de pipettes (Narishige, réf PB-7). Ces micropipettes sont montées sur un dispositif de microinjection (Eppendorf, CellTram Oil), et sont guidées au moyen d'un micromanipulateur (Narishige, réf MN-151) (chapitre 2, figure 2.11).

Comme pour les expériences de microrhéologie, la méduse juvénile est tout d'abord paralysée en la plongeant pendant une dizaine de minutes dans une solution à 7.5% en volume de  $MgCl_2$  diluée dans un rapport 1/1 dans une solution d'eau de mer artificielle. Elle est ensuite placée sur une lamelle de verre, ombrelle étalée, la sous-ombrelle étant en contact avec la lamelle de verre. La pipette est insérée dans la mésoglée à travers l'ex-ombrelle, et est enfoncée jusqu'à ce que son extrémité touche l'endoderme (figure 4.4). Cette opération est réalisée sous le microscope à contraste interférentiel différentiel, muni de l'objectif 20X (microscope Leica DMI 3000 B et objectif Leica PL Fluotar 20X/0.40 Corr). En déplaçant légèrement l'extrémité de la pipette verticalement au moyen du micromanipulateur, il est possible d'appuyer délicatement sur l'endoderme. La déformation de l'endoderme est visualisée au microscope et filmée par la caméra CCD haute résolution (Andor, iXon3 885).

Il est apparu que l'endoderme semble se déformer élastiquement sous l'action de la micropipette : quand la micropipette appuie sur le feuillet endodermique, ce dernier se creuse, puis retrouve sa forme initiale quand la pipette n'exerce plus de contraintes. L'endoderme se comporte mécaniquement comme une mince membrane élastique.

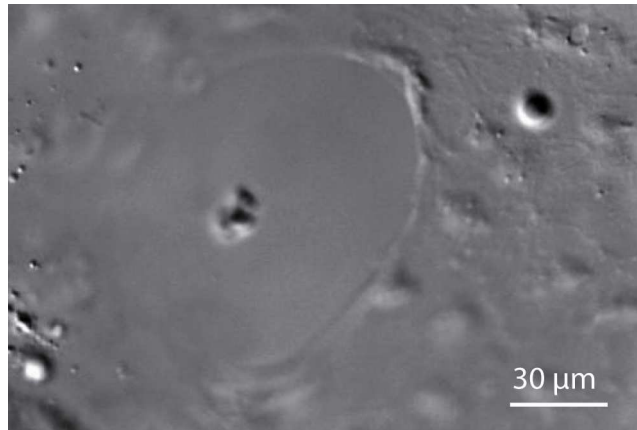


**Figure 4.4** – *Expérience de déformation de l’endoderme via une micropipette insérée dans une méduse juvénile. À gauche (A) : schéma de l’expérience. Endoderme (en) ; ex-ombrelle (ex) ; lamelle (la) ; mésoglée (me) ; micropipette (mi) ; objectif (ob) ; sous-ombrelle (so). À droite (B) : visualisation de l’extrémité de la micropipette, au contact de l’endoderme*

Par ailleurs, nous nous sommes demandé si, au repos, cette membrane élastique était sous contraintes. Pour répondre à cette question, nous avons percé l’endoderme au moyen de la micropipette, afin d’observer si le diamètre du ‘trou’ ainsi créé restait inchangé, augmentait, ou éventuellement diminuait. Un élargissement (respectivement une diminution) du diamètre du trou serait le signe que le feuillet endodermique était sous tension (respectivement sous compression).

Ces expériences ont été réalisées dans les mêmes conditions expérimentales que les expériences de déformation de l’endoderme : la méduse juvénile est paralysée, et est placée ombrelle étalée sur une lamelle de verre ; la pipette est insérée à travers l’ex-ombrelle, et déchire l’endoderme pour percer un trou de l’ordre de 100 μm de diamètre; la visualisation est réalisée par le microscope à contraste interférentiel différentiel muni de l’objectif 20X, et les images sont acquises par la caméra CCD haute résolution (Andor, iXon3 885). La figure 4.5 montre une visualisation d’un ‘trou’ dans l’endoderme.

Il est apparu qu’après percement de l’endoderme, le diamètre du trou reste inchangé. Nous en déduisons qu’au repos, le feuillet endodermique n’est pas sous contrainte.



**Figure 4.5** – Visualisation d'un 'trou' dans l'endoderme en microscopie à contraste interférentiel différentiel, avec l'objectif 20X.

#### **4.1.2.2. L'endoderme et la mésoglée**

Les propriétés mécaniques de la mésoglée ont été décrites en détail dans le chapitre 2. Nous avons établi qu'à l'échelle microscopique, la mésoglée apparaît comme un gel viscoélastique mou, dont les microenvironnements sont très hétérogènes, et dont les modules élastique et visqueux ne dépassent pas quelques dizaines de pascal. Il semble par ailleurs que le module élastique de l'endoderme soit plus important que celui de la mésoglée, car la micropipette pouvait traverser et s'enfoncer dans la mésoglée très facilement, mais perçait et déformait plus difficilement l'endoderme.

Ainsi, l'endoderme inséré dans la mésoglée se comporte d'un point de vue mécanique comme une fine membrane élastique entourée par un gel viscoélastique mou.

#### **4.1.3. Déformations induites lors des contractions**

La mésoglée, l'endoderme et les canaux sont comprimés et déformés à chaque contraction musculaire. Les déformations de ces tissus sont observables *in vivo*, sous le microscope.

##### **4.1.3.1. Protocole**

Nous sélectionnons une méduse juvénile, d'environ 1 cm de diamètre, et présentant de jeunes canaux en croissance. Nous plaçons cette méduse dans la chambre fermée utilisée pour la visualisation des billes des expériences de microrhéologie (chapitre 2, figure 2.14). Cette

chambre est fermée sur les parois supérieure et inférieure par des lamelles de verre, afin de permettre l'observation. La méduse est placée sur la lamelle de verre dans la même position que celle utilisée pour les expériences de microrhéologie (chapitre 2, figure 2.14): la méduse est à plat, ombrelle étalée. L'eau autour de la méduse est retirée au maximum, afin de limiter son glissement. La chambre ronde, placée sur la platine du microscope, est tournée, afin que dans la zone du bord de l'ombrelle observée, les canaux radiaux, déjà formés ou en croissance, soient orientés verticalement de haut en bas (la base des canaux en haut, leur extrémité en bas). La méduse n'est pas paralysée, et se contracte sur la lamelle de verre. Les déformations des tissus sont observées par le microscope à contraste interférentiel différentiel (microscope Leica, DMI 3000 B), muni d'un objectif grossissant 10X (Leica, PL Fluotar 10X/0.30). Les vidéos du bord de l'ombrelle lors d'une contraction sont acquises par une caméra rapide CMOS, à une vitesse de 2000 images par seconde (Fastcam SA3 120K Photron).

Nous avons visualisé les déformations des tissus au bord de l'ombrelle chez sept méduses juvéniles.

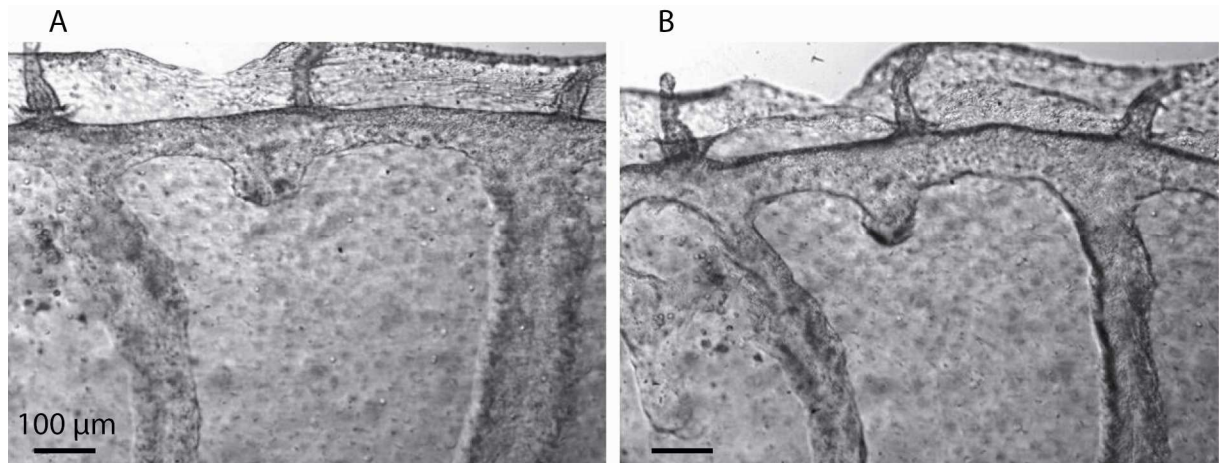
#### **4.1.3.2. Résultats**

Nous présentons une observation typique de visualisation de la déformation des tissus lors d'une contraction musculaire.

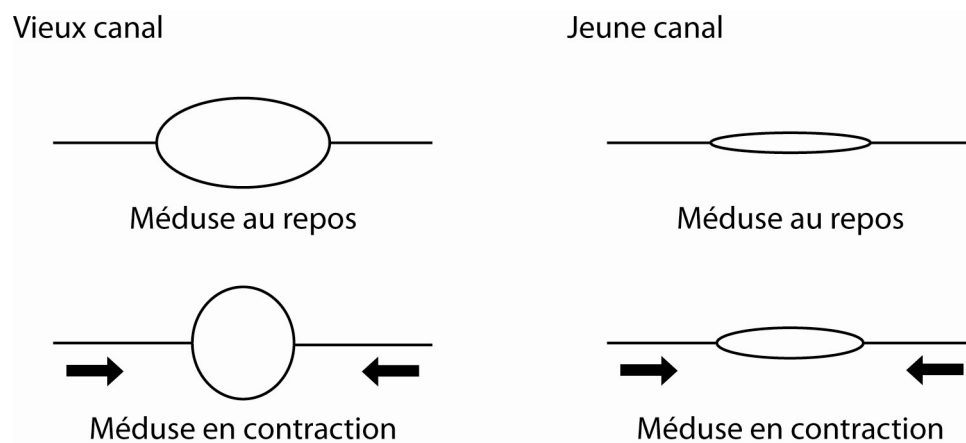
La figure 4.6 présente une image du bord de l'ombrelle d'une méduse juvénile, au repos (figure 4.6 A), et lors d'une contraction musculaire (figure 4.6 B). Nous pouvons reconnaître le canal circulaire en haut de l'image, ainsi qu'un canal en croissance au centre, encadré par un vieux canal radial non branché à droite et un jeune canal radial branché à gauche. Nous observons que les canaux radiaux, ainsi que le canal en croissance, voient leur largeur diminuer fortement lors de la contraction : ces canaux se pincent. Ce pincement est principalement parallèle au bord de l'ombrelle de la méduse, donc dans la direction transversale (perpendiculaire au rayon). Ce pincement des canaux permet de relaxer les contraintes induites par les contractions musculaires, qui, au voisinage du bord de l'ombrelle, sont transversales.

Par ailleurs, nous observons que le vieux canal radial non branché se pince plus fortement que le jeune canal radial branché. Comme nous l'avons observé et indiqué dans le chapitre 3 (paragraphe 3.1.5.3.), les canaux en croissance sont assez plats (leur hauteur est bien inférieure à leur largeur). Nous avons pu également observer au microscope *in vivo* que les jeunes canaux sont beaucoup plus plats que les vieux canaux. Sachant que les canaux croissent par empilement et différenciation des cellules de l'endoderme (chapitre 3, paragraphe 3.2.3.), et que l'endoderme est très plat, il est logique que les canaux en croissance et les jeunes canaux soient plats. Par contre, les vieux canaux, à force d'être pincés par les contractions musculaires et de subir les contraintes hydrodynamiques contre leurs parois liées au passage du courant d'eau, s'arrondissent progressivement, et sont alors moins plats que les

jeunes canaux. La figure 4.7 présente la déformation de la section d'un jeune et d'un vieux canal lors d'une contraction musculaire : les jeunes canaux, parce qu'ils sont très plats, se pincent plus difficilement que les vieux canaux dont la section est plus circulaire.

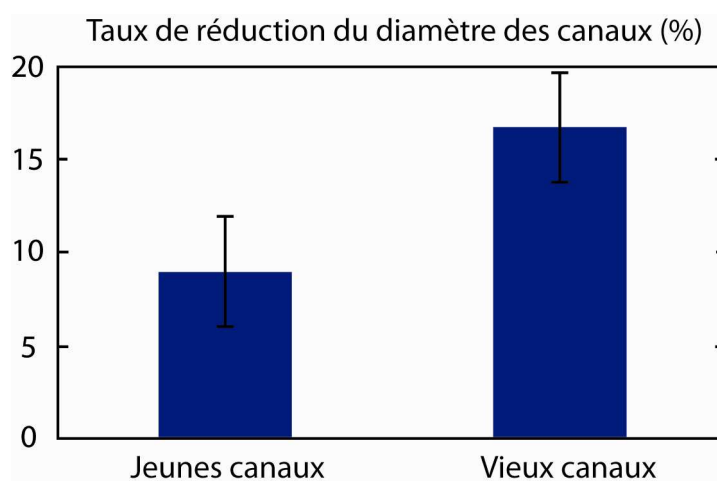


**Figure 4.6** – Bord de l'ombrelle d'une méduse juvénile, au repos et en contraction. Visualisation en microscopie à contraste interférentiel différentiel, avec l'objectif 10X. À gauche (A): bord de l'ombrelle au repos. À droite (B): bord de l'ombrelle en contraction.



**Figure 4.7** – Schéma de coupes des canaux, vieux et jeunes, au repos et en contraction. Les vieux canaux, parce qu'ils sont moins plats, se pincent plus facilement que les jeunes.

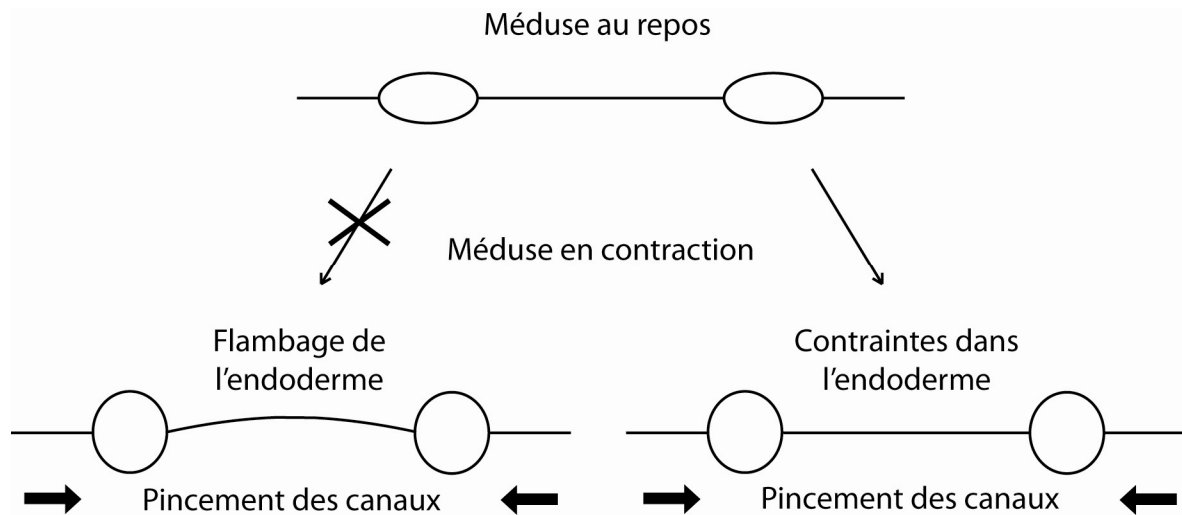
Nous avons mesuré le diamètre des jeunes et vieux canaux au repos et en contraction. La figure 4.8 présente les mesures des taux de réduction de diamètre, TRD, en pourcent, des jeunes et vieux canaux, lors d'une contraction :  $TRD (\%) = 100 \times (D_{\text{repos}} - D_{\text{contract}}) / D_{\text{repos}}$ , où  $D_{\text{repos}}$  est le diamètre moyen d'un canal au repos et  $D_{\text{contract}}$  le diamètre moyen d'un canal en contraction (le diamètre moyen d'un canal est la moyenne de son diamètre mesuré à différentes positions le long du canal). Les valeurs des taux de réduction de diamètre des jeunes et vieux canaux indiquées sur la figure 4.8 sont des valeurs moyennes, calculées à partir des mesures sur sept méduses juvéniles. Les barres d'erreur proviennent de la dispersion des résultats et de l'incertitude des mesures. Le diamètre des jeunes canaux se réduit lors d'une contraction en moyenne de 9%, et celui des vieux canaux de 17%. Il apparaît que, comme nous l'avons observé sur la figure 4.6, les canaux se pincent à chaque contraction musculaire, et les vieux canaux se pincent plus fortement que les jeunes canaux. Notons que les canaux sont en moyenne un peu moins fortement pincés que sur l'image présentée figure 4.6, qui a été choisie parce que le pincement des canaux y est très visible.



**Figure 4.8** – Taux de réduction du diamètre des canaux, vieux et jeunes, lors des contractions musculaires chez les méduses juvéniles.

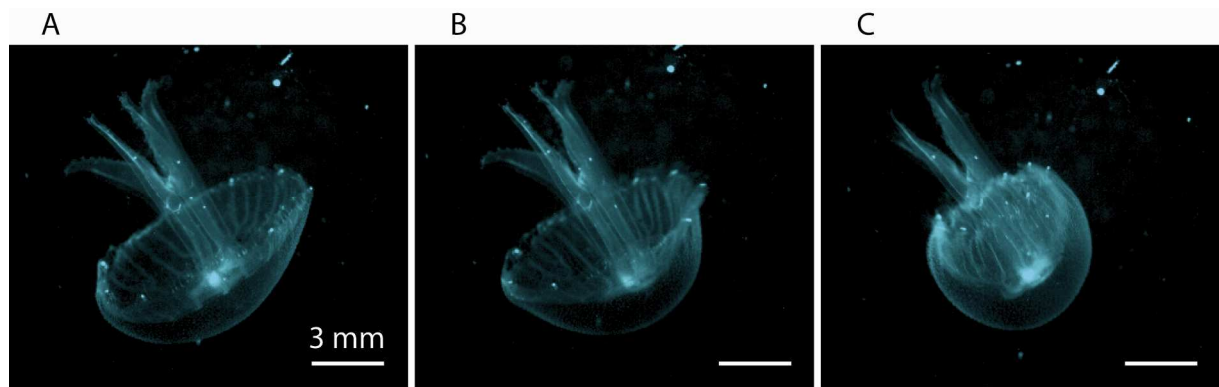
Nous observons enfin, que si les canaux peuvent relaxer les contraintes induites par les contractions musculaires en se pinçant, l'endoderme peut beaucoup plus difficilement se déformer. En effet, cette fine membrane peut difficilement réduire sa surface dans son plan. Elle pourrait flamber (figure 4.9), mais nous n'observons pas de flambage du feuillet endodermique lors des contractions. Il est possible que la matrice, située autour de l'endoderme et dont les fibres sont étroitement attachées à ce dernier, empêche l'endoderme de flamber. Dès lors, si les canaux peuvent relaxer les contraintes en se pinçant et que l'endoderme est quant à lui très peu déformable, les contraintes dues aux contractions musculaires doivent être plus importantes dans l'endoderme (figure 4.9).





**Figure 4.9** – Schéma de coupes des canaux, vieux et jeunes, et de l'endoderme, lorsque la méduse est au repos ou en contraction. Les canaux se pincent. L'endoderme ne flambe pas, et accumule les contraintes de compression. Ce schéma est déduit des observations réalisées au microscope sur des méduses posées à plat sur une lamelle de verre.

Précisons toutefois que ces expériences de visualisation de la déformation des tissus ont été réalisées sur des méduses posées à plat sur des lamelles de verre, afin de permettre l'observation au microscope. Les méduses n'étaient donc pas dans leur position normale, qui leur permet de nager (comme le représentent les figures 4.3 et 4.10). Par conséquent, il est possible que les déformations observées ne correspondent pas exactement aux déformations normales. Si des visualisations de la nage de méduses juvéniles réalisées par Vincent Fleury à la caméra rapide CMOS (à une vitesse de 125 images par seconde) montrent que les canaux se pincent effectivement lors des contractions musculaires (figure 4.10), il n'est pas certain que l'endoderme ne flambe pas lors des contractions. Toutefois, Benjamin Mauroy, avec qui nous collaborons, a initié des simulations numériques, afin de modéliser les contractions des méduses. Les résultats préliminaires montrent que même si le bord de l'ombrelle plie lors d'une contraction, et que l'endoderme flambe légèrement, les contraintes sont toujours importantes dans l'endoderme (paragraphe 4.4.2.).



**Figure 4.10** – *Visualisation de la contraction d’une méduse juvénile. À gauche (A) : repos. Au milieu (B) : début de la contraction. À droite (C) : contraction. Les canaux, et leur pincement lors de la contraction, sont visibles.*

## 4.2. Répartition des contraintes : modélisation par éléments finis

Nous avons réalisé des simulations numériques par éléments finis, afin de modéliser les contractions musculaires et de calculer numériquement la répartition des contraintes qui en découle dans l’endoderme.

La modélisation de la contraction de l’ombrelle de la méduse, et le calcul de la répartition des contraintes dans l’endoderme ont été initiés par Étienne Pillin, qui a réalisé son stage de M1 au laboratoire, en collaboration avec Ken Sekimoto, et avec l’aide de Vincent Fleury. Étienne Pillin a réalisé ces modélisations par la méthode des éléments finis, qui permet de résoudre numériquement des équations aux dérivées partielles, et qui s’applique notamment à la résolution des problèmes de déformation d’objets élastiques sous contrainte.

Il a réalisé ces modélisations avec le programme FreeFem++, qui utilise un langage très proche du C++, enrichi de bibliothèques permettant entre autres de créer des maillages 2D et 3D, de résoudre une équation aux dérivées partielles, et de faire des calculs de différenciation finie. Il a montré, par un modèle bidimensionnel, que les contraintes induites par les contractions musculaires sont plus importantes dans l’endoderme à l’extrémité d’un canal en croissance.

Nous avons ensuite repris et amélioré ce modèle avec le programme Comsol (COMSOL Multiphysics 3.5a), qui permet également la modélisation par éléments finis de problèmes de physique. Philippe Dantan et Benjamin Mauroy, qui utilisent ce programme au quotidien, nous ont très largement aidées à modéliser et à résoudre numériquement la répartition des contraintes dans l’endoderme induite par les contractions musculaires.

Nous présentons dans les paragraphes suivants le principe de la méthode des éléments finis, puis le modèle mis en place, et enfin les résultats obtenus.

#### 4.2.1. Principe

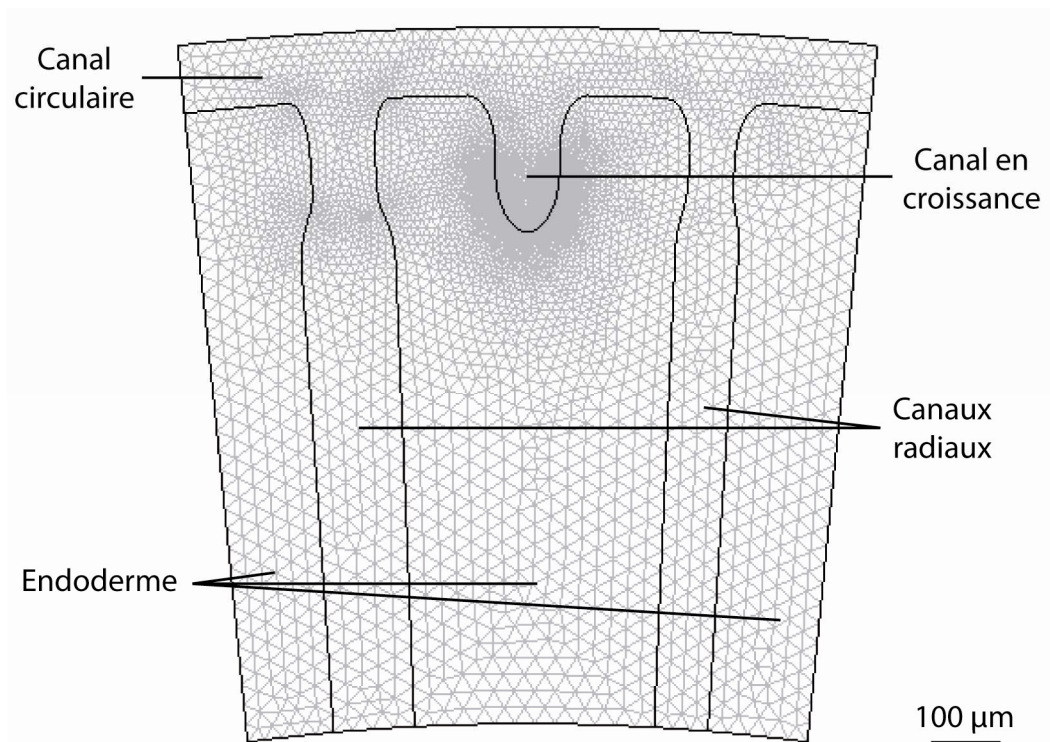
La méthode des éléments finis permet de résoudre numériquement des équations aux dérivées partielles. Ces dernières peuvent représenter analytiquement le comportement dynamique de systèmes physiques (mécanique, thermodynamique, acoustique...). Dans cette méthode, les équations aux dérivées partielles sont résolues de manière discrète. Cette discrétisation repose sur un découpage de l'espace selon un maillage. On utilise habituellement un maillage triangulaire dans un espace bidimensionnel et tétraédrique dans un espace tridimensionnel. Sur chaque maille sont définies des 'fonctions de base', qui vont permettre d'approcher la solution de l'équation différentielle. Par exemple, dans le modèle présenté au paragraphe suivant, les fonctions de base utilisées sont des polynômes de Lagrange de degré 2. Les mailles, associées à ces fonctions de base, forment les 'éléments finis'. Notons que mathématiquement, plus le maillage est fin, plus la solution obtenue par la méthode des éléments finis satisfait précisément à l'équation aux dérivées partielles. C'est pourquoi le maillage n'est souvent pas défini de manière régulière, mais est resserré près des endroits d'intérêt, notamment aux endroits où la solution varie beaucoup. Cependant, un maillage trop fin induit des propagations d'erreurs informatiques de troncature. C'est pourquoi il est conseillé de tester un modèle avec un maillage de plus en plus fin, et de s'arrêter quand les résultats ne dépendent plus de la taille du maillage. Cette méthode a été appliquée dans le modèle décrit au paragraphe suivant.

#### 4.2.2. Modèle

Nous avons choisi, notamment pour des raisons de simplicité et de rapidité des calculs, de réaliser la modélisation en deux dimensions. Comme nous l'avons vu au chapitre 3, l'endoderme est un feuillet cellulaire plat et très fin. Il se prête donc particulièrement bien à une représentation bidimensionnelle. Par contre, les canaux et la mésoglée s'y prêtent moins bien. Cependant, comme nous l'avons vu au chapitre 2 et au paragraphe 4.1.2., la mésoglée est un tissu viscoélastique très mou et très déformable, alors que l'endoderme est une membrane plus rigide, quasiment purement élastique. Nous choisissons donc de ne pas inclure la mésoglée dans le modèle. Notons que la présence de la mésoglée est prise en compte de manière indirecte, car, dans ce modèle 2D, l'endoderme ne peut pas sortir du plan, et donc ne flambe pas. Nous avons vu au paragraphe 4.1.3. que c'est vraisemblablement la présence de la mésoglée qui, *in vivo*, empêche le flambage de l'endoderme. La mésoglée n'est donc pas représentée dans le modèle, et l'endoderme est modélisé comme une surface bidimensionnelle élastique. La structure tubulaire des canaux ne peut pas être représentée telle quelle sur un modèle 2D. Néanmoins, nous avons vu au paragraphe 4.1.3., que lors d'une contraction musculaire, les canaux se pinçaient et l'endoderme se déformait beaucoup moins. Nous avons donc modélisé en 2D les canaux par une surface, dont les propriétés mécaniques la rendent plus déformable que celle de l'endoderme.

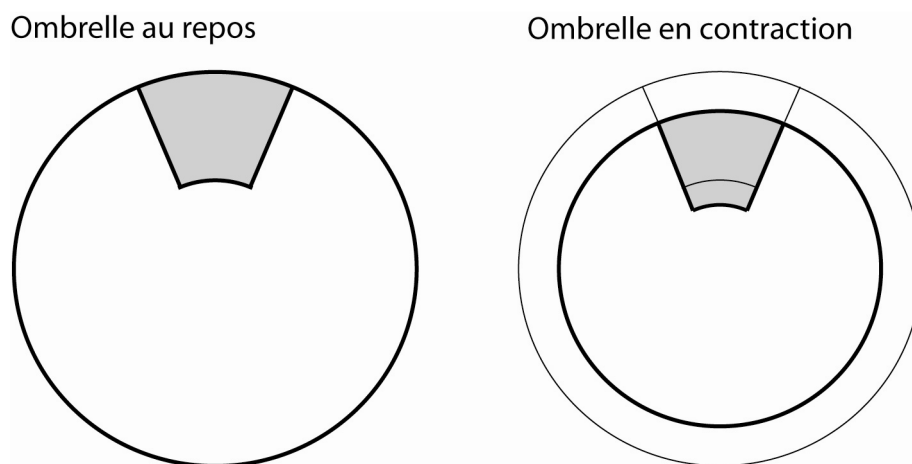
Nous avons modélisé en deux dimensions un morceau du bord de l'ombrelle d'une méduse juvénile. La figure suivante (figure 4.11) représente le dessin, réalisé sous Comsol, des canaux au bord de l'ombrelle, ainsi que le maillage associé. Nous représentons le canal circulaire, un canal en croissance, encadré par deux canaux radiaux, de diamètres légèrement différents (comme c'est le cas *in vivo*, la plupart du temps), ainsi que l'endoderme, qui est situé entre ces canaux. Les dimensions de ce dessin et les formes des canaux correspondent aux observations réalisées *in vivo* dans des méduses juvéniles, telles qu'on peut les voir sur la figure 4.6. Le maillage est plus resserré autour du canal en croissance, car, comme nous le verrons par la suite, les contraintes varient beaucoup dans cette zone. Nous avons vérifié qu'en prenant des maillages plus fins, les résultats sont identiques.

Sur ce dessin, l'espace est ainsi séparé entre deux domaines jointifs : les canaux, et l'endoderme. Nous avons vu aux paragraphes 4.1.2. et 4.1.3. que l'endoderme est un feuillet élastique, peu déformable lors d'une contraction musculaire. Nous choisissons donc d'attribuer au domaine correspondant à l'endoderme les propriétés mécaniques d'une membrane élastique incompressible, de module de Young  $E_{\text{endo}} = 100 \text{ Pa}$  et de module de Poisson  $\nu_{\text{endo}} \sim 0.5$  (incompressibilité). Afin que les canaux soient plus déformables, nous les modélisons par une membrane élastique légèrement compressible, de module de Young inférieur,  $E_{\text{canal}} = 10 \text{ Pa}$  et de module de Poisson  $\nu_{\text{canal}} = 0.3$ , qui permet la compression. Notons que la valeur d'élasticité de l'endoderme *in vivo* n'a pas été mesurée. Cependant, comme nous l'avons vu au paragraphe 4.1.2., l'endoderme apparaît comme plus rigide que la mésoglée, qui a un module élastique d'un ordre de grandeur de 10 Pa. Dès lors, il apparaît raisonnable de fixer la valeur du module de Young de l'endoderme autour de 100 Pa. La valeur du module de Young des canaux est fixée comme étant inférieure, car ils sont plus déformables que l'endoderme. Nous avons observé qu'en la choisissant 10 fois inférieure à celle de l'endoderme, nous obtenions des taux de réduction du diamètre des canaux proches de ceux observés *in vivo* (figure 4.8). Notons que si la valeur des contraintes dans l'endoderme change avec la valeur des modules de Young de l'endoderme et des canaux, la répartition de ces contraintes ne dépend pas de la valeur du module de Young de l'endoderme, tant que celle-ci reste supérieure à celle des canaux.



**Figure 4.11** – Maillage du dessin, réalisé sous Comsol, d'une tranche d'ombrelle d'une méduse juvénile.

Le morceau de l'ombrelle de méduse modélisé correspond à une 'tranche' de l'ombrelle. Nous avons vu au paragraphe 4.1.1. qu'une contraction musculaire correspond à une réduction du diamètre de l'ombrelle de la méduse. C'est pourquoi, comme schématisé sur la figure 4.12, nous modélisons une contraction musculaire par une diminution de la surface de la tranche de l'ombrelle, correspondant à la réduction du diamètre de l'ombrelle.



**Figure 4.12** – Schéma de l'ombrelle au repos et en contraction. Une tranche de l'ombrelle est coloriée en gris. À gauche, schéma de l'ombrelle au repos. À droite, schéma de l'ombrelle en contraction (en noir), superposé à celui de l'ombrelle au repos (en gris).

Pour modéliser la déformation de la tranche de l'ombrelle représentée sur la figure 4.12, nous imposons une avancée de la paroi en arc de cercle du bord de l'ombrelle (paroi 1, figure 4.13), et un glissement des parois des bords de la tranche (parois 2 et 3, figure 4.13) le long des axes radiaux. La dernière paroi (paroi 4, figure 4.13) est laissée libre. L'amplitude et la vitesse du déplacement de la paroi 1 correspond aux amplitudes et vitesses de déplacement des bords d'ombrelles observés *in vivo* dans des méduses juvéniles lors des contractions musculaires : le déplacement imposé de la paroi est de 200  $\mu\text{m}$ , en 1 s.

Le logiciel, connaissant les propriétés mécaniques des différents domaines (canaux et endoderme), ainsi que les conditions aux bords et le déplacement imposé de la paroi du bord de l'ombrelle, résout les équations de l'élasticité au cours du temps, et calcule les contraintes sur chaque maille, en fonction du temps (toutes les 100 ms). Le résultat cherché est la répartition des contraintes dans l'endoderme à l'issue de la contraction.

Le modèle étant bidimensionnel, nous avons choisi le modèle 'Plane Stress' de Comsol, qui permet de calculer les contraintes pour des déplacements dans le plan (x,y), correspondant au plan de l'endoderme. Dans ce modèle, les valeurs des contraintes  $\sigma_{zz}$ ,  $\sigma_{yz}$  et  $\sigma_{zx}$  sont fixées à zéro.

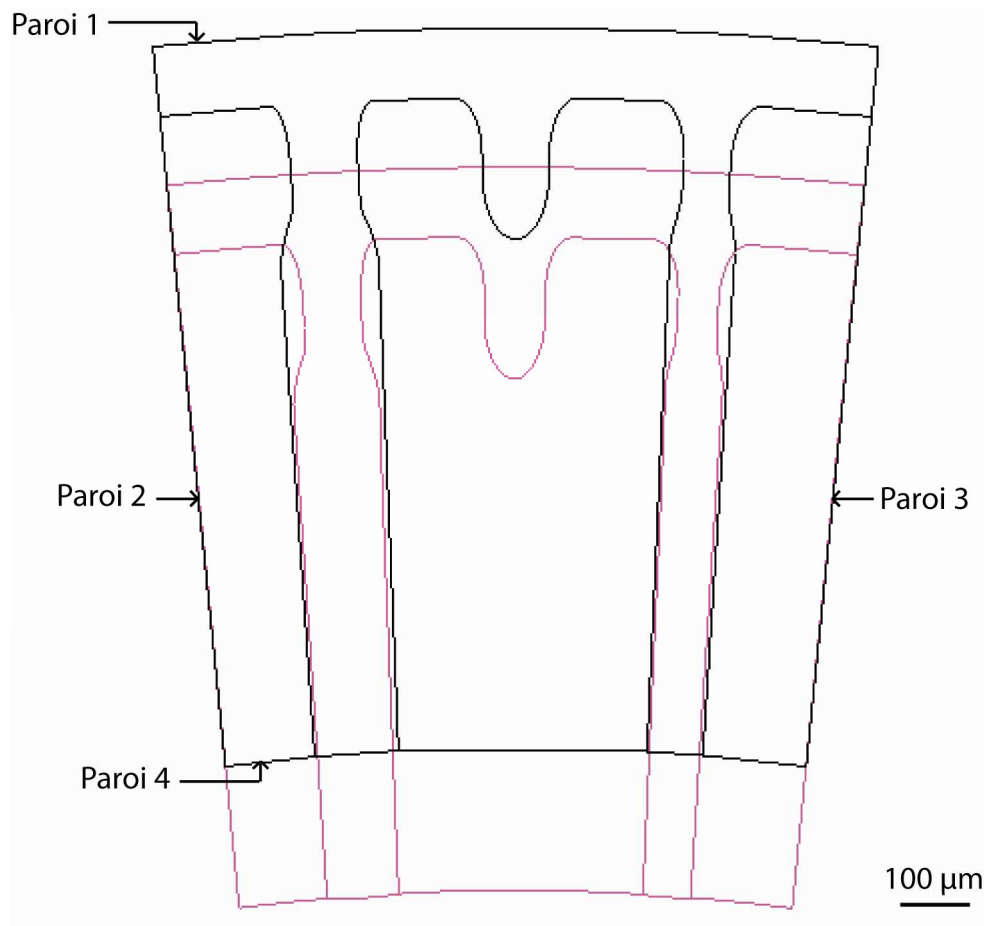
Nous avons observé séparément les différentes contraintes sur l'endoderme :  $\sigma_{xx}$ ,  $\sigma_{yy}$  et  $\sigma_{xy}$ . Les contraintes de von Mises, obtenues en combinant ces différentes contraintes, donnent une représentation scalaire satisfaisante de la répartition des contraintes dans l'endoderme.

En trois dimensions, la contrainte de von Mises  $\sigma_{vm}$  est égale à :

$$\sigma_{vm} = \sqrt{\frac{1}{2}(\sigma_{xx} - \sigma_{yy})^2 + \frac{1}{2}(\sigma_{yy} - \sigma_{zz})^2 + \frac{1}{2}(\sigma_{zz} - \sigma_{xx})^2 + 3(\sigma_{xy} + \sigma_{yz} + \sigma_{zx})^2} \quad 4.1$$

En deux dimensions, avec le modèle 'plane stress', elle devient :

$$\sigma_{vm} = \sqrt{\sigma_{xx}^2 - \sigma_{xx}\sigma_{yy} + \sigma_{yy}^2 + 3\sigma_{xy}^2} \quad 4.2$$



**Figure 4.13** – Dessin, réalisé sous Comsol, d’une tranche d’ombrelle d’une méduse juvénile, au repos et en contraction. Les traits noirs correspondent à la situation au repos et les traits roses à celle en contraction.

### 4.2.3. Résultats

La figure suivante (figure 4.14) montre le résultat de la distribution des contraintes dans l’endoderme résultant de la contraction musculaire de la tranche d’ombrelle modélisée. Les tracés des canaux avant et après contraction sont représentés. Les couleurs correspondent aux valeurs de la contrainte de von Mises, qui permet de prendre en compte toutes les contraintes dans le plan (équation 4.2). Le codage des couleurs à droite indique la correspondance entre les couleurs et la valeur de la contrainte.

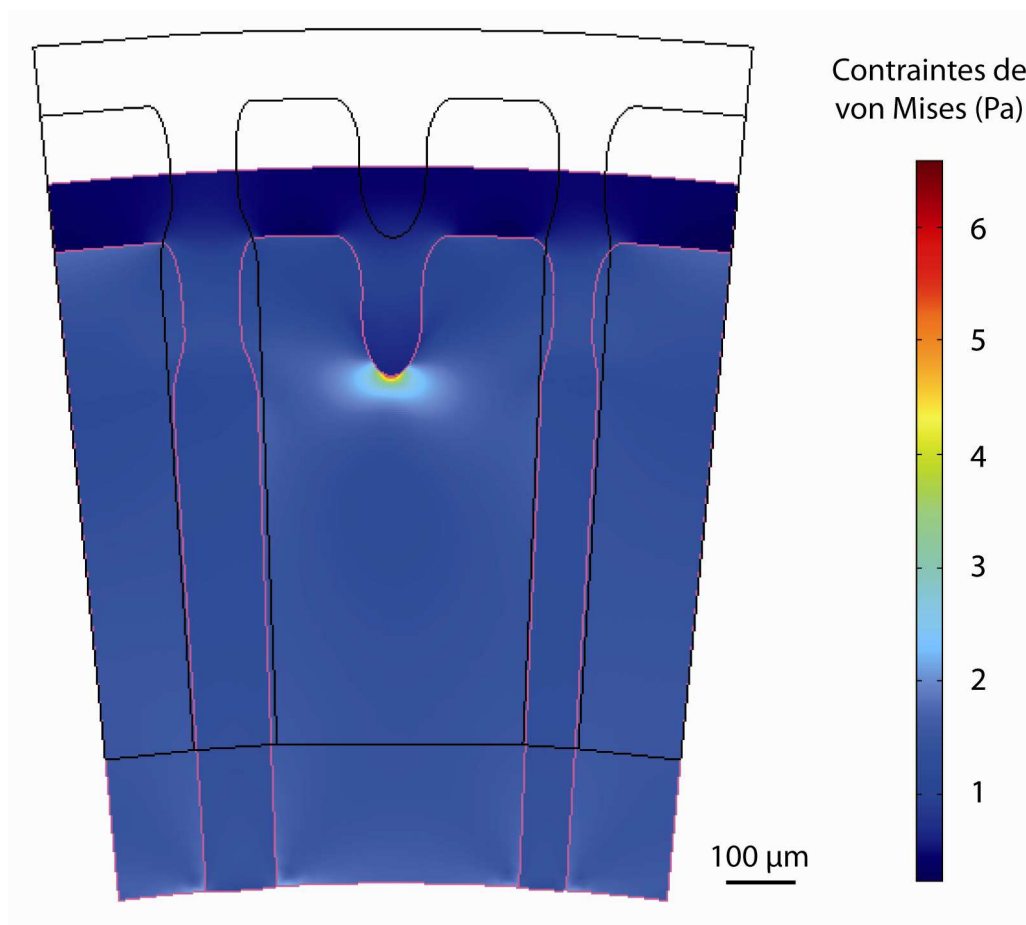
Nous observons, en comparant les tracés des canaux avant et après contraction, que la contraction musculaire induit une diminution de la largeur des canaux, qui reflète le pincement des canaux observé *in vivo* (décrit paragraphe 4.1.3.). Dans le modèle, la réduction globale de la surface de la tranche d’ombrelle liée à la contraction induit une compression plus grande des zones dont le module élastique est plus faible, donc qui sont plus déformables, à savoir les canaux. *In vivo*, les contraintes musculaires induisent également une



compression plus grande des zones les plus déformables que sont les canaux, par pincement. Le modèle décrit donc assez bien les déformations des tissus observées *in vivo*.

Par ailleurs, nous observons que les contraintes de von Mises sont plus importantes dans l'endoderme, à l'extrémité du canal en croissance (il en est de même des contraintes  $\sigma_{xx}$ ,  $\sigma_{yy}$  et  $\sigma_{xy}$  prises individuellement). Nous avons vérifié que ce résultat restait vrai avec un maillage de plus en plus fin. Comme mentionné précédemment, le fait que les contraintes varient fortement à l'extrémité du canal en croissance, et le fait que cette zone soit une région d'intérêt pour notre étude, justifient le choix d'un maillage localement plus serré.

Nous pouvons expliquer par une analogie physique le fait que les contraintes soient plus importantes à l'extrémité du canal en croissance. Il est connu que l'apparition de fractures correspond à une relaxation des contraintes dans un matériau [34,62]. Par ailleurs, si l'on considère l'avancée d'une fracture, les contraintes sont les plus fortes à son extrémité, ce qui permet à la fracture, une fois qu'elle a été initiée, de se propager rapidement [28,77]. Les canaux, en se pinçant, permettent de relaxer les contraintes de compression induites dans les tissus par les contractions musculaires. Ainsi, la croissance d'un canal dans l'endoderme permet la relaxation des contraintes de compression. Dès lors, comme pour les fractures, les contraintes se concentrent à l'extrémité du canal en croissance.



**Figure 4.14** – Résultat du modèle réalisé sous Comsol : répartition des contraintes de von Mises dans la tranche d'ombrelle lors d'une contraction musculaire.

La modélisation par éléments finis montre que les contraintes induites par les contractions musculaires sont maximales dans l'endoderme, à l'extrémité d'un canal en croissance. Nous pouvons alors nous demander si de fortes contraintes dans l'endoderme ne permettent pas la croissance de ce canal dans l'endoderme. Cette hypothèse est examinée dans le paragraphe suivant.

### **4.3. Application extérieure de contraintes**

Nous avons vu dans le chapitre 3 qu'un canal en croissance croît au niveau de son extrémité, par empilement et différenciation des cellules de l'endoderme en cellules de canal (chapitre 3, paragraphe 3.2.3.). Par ailleurs, les expériences de modélisation par éléments finis ont montré que lors d'une contraction musculaire, les contraintes dans l'endoderme sont les plus fortes à l'extrémité d'un canal en croissance. Dès lors, il est possible que les contraintes de compression dans l'endoderme induites par les contractions musculaires jouent un rôle dans l'empilement des cellules de l'endoderme et leur différenciation en cellules de canal à l'extrémité d'un canal en croissance.

Notons que des contraintes de compression dans l'endoderme peuvent favoriser le glissement des cellules de l'endoderme les unes sur les autres, et leur empilement, afin de permettre la croissance d'un canal. Par ailleurs, nous avons vu au chapitre 3 (paragraphe 3.2.4.) que les cellules de l'endoderme se divisaient vraisemblablement perpendiculairement au plan de l'endoderme. Or, il a par ailleurs été démontré que les divisions cellulaires se font perpendiculairement à la direction de la contrainte [53,63]. Si l'endoderme subit des contraintes de compression dans son plan, il serait donc cohérent que les divisions cellulaires se fassent perpendiculairement au plan de l'endoderme.

Afin de vérifier que les contraintes de compression dans l'endoderme induisent l'empilement des cellules de l'endoderme et leur différenciation en cellules de canal, nous avons mis au point une expérience permettant d'appliquer de manière externe des contraintes sur des méduses immobilisées, et d'observer les changements morphologiques induits dans l'endoderme, dans les zones de fortes contraintes. Ces contraintes externes sont appliquées dans une direction différente des directions des contraintes appliquées par les muscles *in vivo*, afin d'observer si la croissance des canaux est alors modifiée. Dans une première partie, nous décrirons le principe de l'expérience et le matériel expérimental. Puis nous exposerons le protocole, et enfin nous présenterons les résultats.

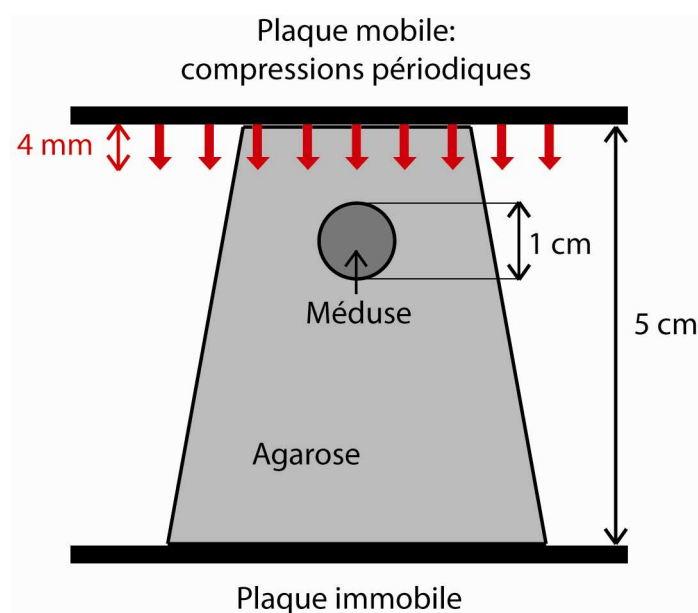
#### **4.3.1. Principe de l'expérience et matériel expérimental**

La mise au point de l'expérience et l'interprétation des résultats ont été réalisées à l'aide d'Alexis Peaucelle. Le principe de l'expérience est d'anesthésier une méduse juvénile, et de la

plonger dans un bloc d'agarose fabriqué avec la solution d'anesthésiant (chlorure de magnésium dans de l'eau de mer artificielle), afin que la méduse reste immobile pendant toute la durée de l'expérience (une nuit). Ce bloc d'agarose est placé entre deux plaques : l'une est immobile, et l'autre peut effectuer des mouvements contrôlés, d'avant-arrière, afin de pouvoir compresser périodiquement le bloc d'agarose, et donc la méduse (figure 4.15). Nous avons choisi de comprimer l'endoderme de la méduse *via* un bloc d'agarose afin que l'expérience soit la moins invasive possible. Il aurait en effet été envisageable d'exercer des contraintes *in vivo*, directement sur l'endoderme, localement, mais une telle expérience aurait été très invasive.

Les compressions exercées de manière extérieure sont alors unidirectionnelles (comme indiqué sur la figure 4.15), et non annulaires, comme elles le sont *in vivo*, *via* les contractions musculaires (paragraphe 4.1.1.). Les contraintes externes sont alors différentes des contraintes physiologiques, ce qui permet d'observer si elles induisent une éventuelle modification de la morphogenèse gastrovasculaire, et notamment l'apparition de nouveaux canaux perpendiculairement à la direction de cette contrainte externe.

Notons qu'une expérience envisageable serait de paralyser totalement la méduse, et de voir si alors la croissance des canaux est stoppée. Nous avons observé qu'il était très difficile de maintenir la méduse complètement paralysée pendant longtemps, sans endommager ses tissus (ce point sera détaillé dans le paragraphe suivant). C'est pourquoi nous avons préféré paralyser légèrement la méduse, et exercer des contraintes de compression externes.



**Figure 4.15** – Schéma de l'expérience de compression d'une méduse juvénile dans l'agarose.

La figure 4.16 est une photo du dispositif permettant de comprimer périodiquement le bloc d'agarose. Il a été réalisé au laboratoire, par Mathieu Receveur, Arnaud Grados et Laurent

Réa. La pièce 1 est un générateur, permettant de contrôler la fréquence et la force des compressions. La pièce 2 est l'appareil de compression avec les deux plaques (l'une mobile et l'autre immobile), sur lequel est placé le bloc d'agarose. Ce générateur émet des créneaux de tension (l'amplitude, la durée, et la fréquence de ces créneaux sont contrôlables). La plaque mobile de l'appareil de compression est mise en mouvement par deux aimants placés au sein de deux bobines : lorsqu'on applique une tension aux bornes des bobines, les aimants sont mis en mouvement par les forces de Laplace, et déplacent la plaque (figure 4.17). Un ressort, placé derrière la plaque, se tend quand la plaque est déplacée. Quand la tension appliquée aux bornes de la bobine revient à 0, les aimants ne subissent plus de forces, le ressort se détend, et les aimants et la plaque mobile reviennent à leur position initiale (figure 4.17). Ainsi, des tensions créneaux permettent d'obtenir un mouvement d'aller-retour de la plaque mobile. Augmenter l'amplitude de ces créneaux permet d'augmenter les forces de Laplace, et de déplacer les aimants, et donc la plaque, plus fortement.

Notons que le déplacement de la plaque mobile par des aimants *via* des bobines est plus rapide qu'un déplacement effectué par un moteur standard. Il était en effet nécessaire de déplacer la plaque rapidement, afin de s'approcher de la vitesse des contractions musculaires : la propagation de la vague de contraction musculaire autour de l'ombrelle d'une méduse *Aurelia aurita* adulte se fait à environ 50 cm/s [66], et donc la méduse adulte, de 10 cm de diamètre, se contracte en environ 500 ms. Les aimants et les bobines permettent de déplacer la plaque mobile en quelques centaines de millisecondes, ce qu'un moteur standard ne pourrait pas faire.

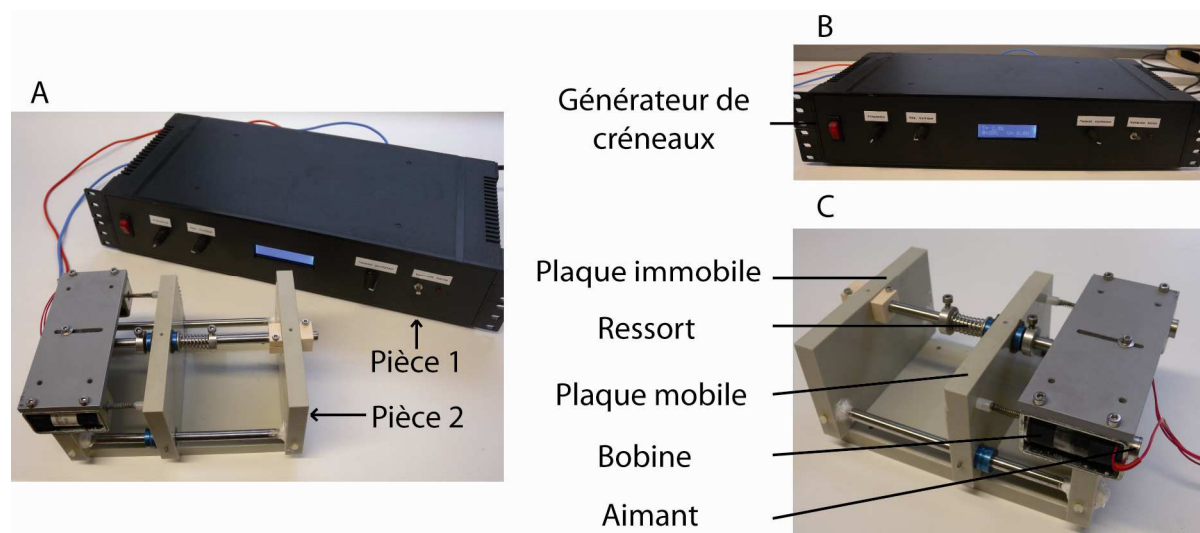
La distance parcourue par la plaque à chaque aller-retour est réglable mécaniquement. Elle est ajustée pour que la compression exercée soit de l'ordre de grandeur de la compression provoquée par les contractions musculaires. Comme nous l'avons mentionné au paragraphe 4.1.1., lors d'une contraction musculaire, le diamètre de l'ombrelle de la méduse était réduit de l'ordre de dix pourcents. Par conséquent, pour un bloc d'agarose de plusieurs centimètres de long, l'amplitude du déplacement de la plaque doit pouvoir être de plusieurs millimètres, ce que permet l'appareil de compression.

L'amplitude de la tension créneau est ajustée pour permettre de déplacer la plaque sur la longueur désirée, en prenant compte de la tension du ressort, dont le rôle est de ramener ensuite la plaque à sa position initiale (figure 4.17).

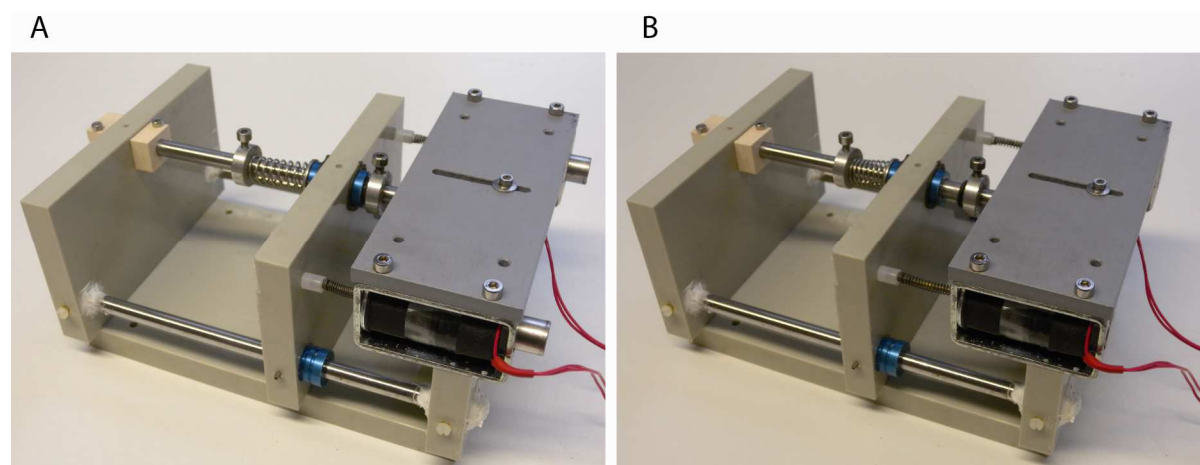
Ajuster la durée des créneaux permet de contrôler le temps de compression du bloc d'agarose, à chaque aller-retour de la plaque. La plaque peut ainsi exercer un mouvement de compression analogue à celui exercé par les muscles : une contraction rapide, qui se maintient pendant une centaine de millisecondes, puis une décontraction plus lente, assurée par l'élasticité de la mésoglée dans la méduse [60,106], et par la détente du ressort dans l'appareil de compression (figure 4.17).

La fréquence des contractions étant de l'ordre d'un battement toutes les deux secondes [132], la période des créneaux du générateur, et donc des déplacements de la plaque, est ajustée à deux secondes.

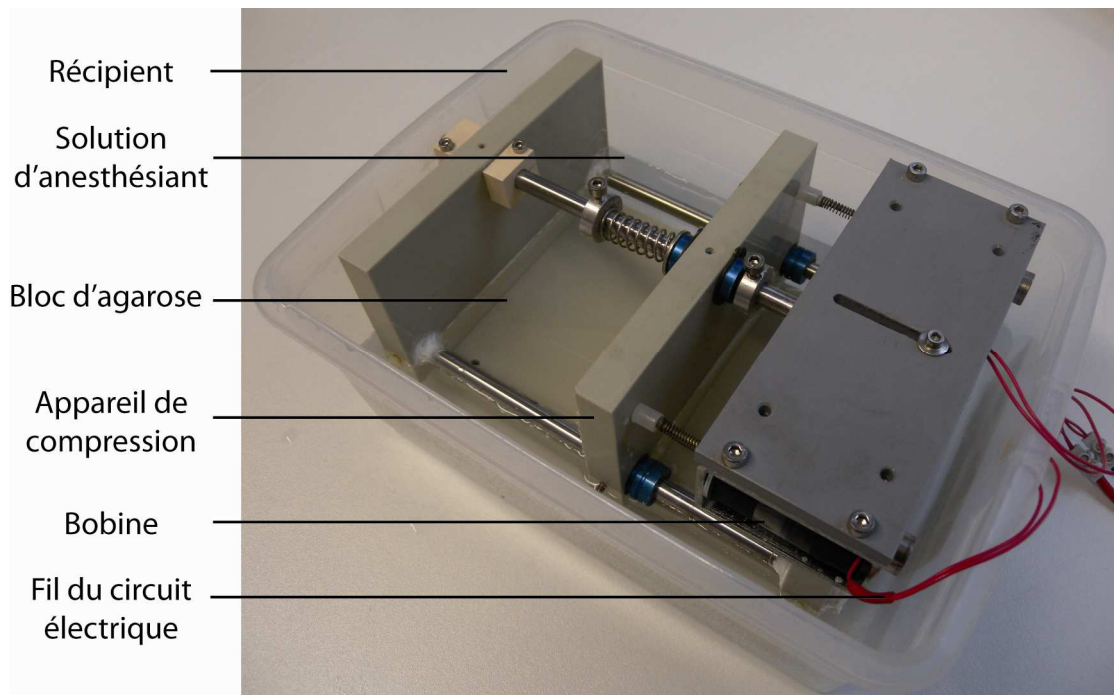
Les paramètres expérimentaux permettant de satisfaire les différents points précédemment énoncés sont les suivants : la distance parcourue par la plaque est d'environ 4 mm, la tension des créneaux de 8 V, leur durée de 100 ms, et leur période de 2 s.



**Figure 4.16** – Photos des pièces de l'expérience de compression. À gauche (A) : pièces 1 et 2. En haut à droite (B) : pièce 1, générateur de compression. En bas à droite (C) : pièce 2, appareil de compression.



**Figure 4.17** – Appareil de compression, et déplacement de la plaque mobile. À gauche (A) : appareil en position initiale ; les aimants et la plaque mobile sont à leur position initiale, le ressort est détendu. À droite (B) : appareil en position de compression ; les aimants et la plaque mobile sont déplacés, le ressort est tendu.



**Figure 4.18** – *Appareil de compression, dans le récipient contenant la solution d'anesthésiant. Le bloc d'agarose (que l'on peut deviner sur la photo) est inséré entre les deux plaques de l'appareil.*

Le bloc d'agarose contenant la méduse est comprimé pendant au moins une nuit. Afin d'éviter que l'agarose ne sèche pendant ce temps, et donc que la méduse ne meure, le bloc d'agarose est, tout en étant comprimé, immergé dans la solution d'anesthésiant (figure 4.18). La partie inférieure de l'appareil de compression, qui supporte le bloc d'agarose, est immergée, et sa partie supérieure, qui contient les bobines et le circuit électrique permettant de les alimenter, est à l'air (figure 4.18). La partie immergée de l'appareil de compression est construite avec des matériaux résistants à l'eau de mer (plastique et acier inoxydable).

### 4.3.2. Protocole

Après avoir présenté le principe de l'expérience et le matériel expérimental, détaillons le protocole suivi pour réaliser les expériences d'applications extérieures de contraintes dans l'endoderme.

Nous commençons par préparer deux litres de solution d'anesthésiant en diluant par cinq une solution à 7.5% en volume de  $\text{MgCl}_2$  dans de l'eau de mer artificielle.

Nous préparons ensuite 100 mL d'agarose à 0.7% dans cette solution d'anesthésiant. Cette solution est obtenue en mélangeant 0.7 g d'agarose se solidifiant à basse température (Sigma,

A9414) à 100 mL de la solution d'anesthésiant, puis en chauffant à 60 °C cette solution, avec agitation magnétique, pendant 1 h.

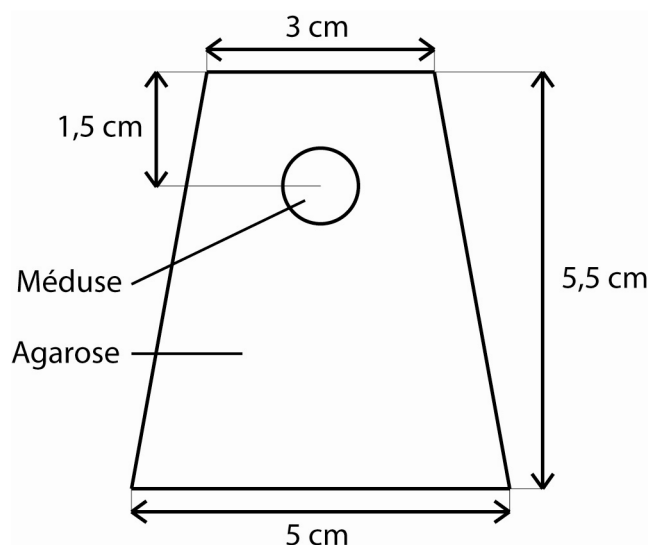
Nous sélectionnons ensuite une méduse juvénile, d'environ 1 cm de diamètre. Cette méduse est paralysée en la plongeant pendant environ un quart d'heure dans la solution d'anesthésiant. Notons que nous n'utilisons pas la même solution d'anesthésiant que celle employée précédemment pour les expériences de microrhéologie (une solution à 7.5% en volume de  $MgCl_2$  diluée dans un rapport 1/1 dans de l'eau de mer artificielle). Nous avons en effet observé que si nous maintenions la méduse paralysée pendant toute une nuit dans cette solution, dont la concentration en chlorure de magnésium est assez élevée, les fibres musculaires de la méduse s'altéraient beaucoup, et finissaient par se contracter de manière permanente, ce qui perturbait beaucoup l'expérience. Nous avons donc dilué la solution de chlorure de magnésium, jusqu'à ce que la solution anesthésiante ne lèse plus les fibres musculaires d'une méduse plongée dedans pendant toute une nuit. Il est apparu qu'une dilution par 5 de la solution de  $MgCl_2$  à 7.5% en volume était satisfaisante. Nous avons toutefois observé que cette solution très diluée, si elle rendait impossibles les contractions globales de la méduse, n'empêchait pas de légères contractions locales des fibres, de-ci de-là. Notons également que la méduse pouvait être immergée jusqu'à 5 jours dans une telle solution, sans dommages musculaires.

Une fois la méduse paralysée, nous prenons une image globale de cette dernière, et de son réseau de canaux, avec une loupe binoculaire (Leica, Z16 APO), équipée d'une caméra CCD (Stingray F-201 B) contrôlée par un logiciel de visualisation (AVT SmartView 1.11). Nous prenons également des images plus précises de son réseau de canaux et de l'endoderme avec le microscope à contraste interférentiel différentiel muni de l'objectif 10X (Leica, PL Fluotar 10X/0.30), et équipé de la caméra CCD haute résolution (Andor, iXon3 885).

Les 100 mL d'agarose liquide sont refroidis jusqu'à 30°C, puis sont coulés dans un récipient carré de 10 cm de côté et de 2 cm de haut. La méduse juvénile paralysée est insérée dans l'agarose encore liquide et est placée ombrelle étalée. Afin de placer la méduse dans cette position, nous l'insérons à mi-hauteur du bain d'agarose, sous-ombrelle vers le haut et nous étalons son ombrelle en laissant tomber quelques gouttes d'agarose sur la surface du bain d'agarose, au dessus de la méduse (le choc des gouttes ouvre mécaniquement l'ombrelle de la méduse). Le bloc d'agarose contenant la méduse refroidit jusqu'à atteindre la température ambiante, et se solidifie. L'agarose à 0.7% est suffisamment concentré pour devenir un bloc solide en se refroidissant, et suffisamment peu concentré pour être compressible et peu cassant, ce qui réduit les risques de brisure du bloc d'agarose lorsqu'il subit les contraintes de compression pendant toute une nuit. Une fois que l'agarose a refroidi, la méduse se trouve insérée dans un bloc d'agarose solide de 10 cm de côté et 1 cm de haut. Nous découpons l'agarose autour de la méduse, pour obtenir un bloc en forme de trapèze autour de la méduse (figure 4.19). Nous avons observé expérimentalement que cette forme et ces dimensions permettaient à l'agarose à 0.7% de ne pas se briser lors des contraintes de compression. Notons qu'il est nécessaire d'utiliser de l'agarose qui se solidifie à basse température (30°C au lieu de 60°C) car la méduse doit pouvoir être insérée dans l'agarose liquide et rester vivante.



Le bloc en forme de trapèze contenant la méduse est immergé dans la solution d'anesthésiant, afin de rester hydraté, et est mis au réfrigérateur à 15°C pendant 1 h. À cette température, le bloc d'agarose se rétracte légèrement. Comme l'expérience de compression est réalisée pendant toute une nuit à 15°C, il est nécessaire d'ajuster la position des plaques mobiles et immobiles de compression sur le bloc présentant les dimensions qu'il a à cette température, et non à température ambiante. Après avoir été refroidi à 15°C, le bloc d'agarose est placé entre les deux plaques de l'appareil de compression. Ce dernier est alors déposé dans un récipient contenant environ 0.7 L de la solution d'anesthésiant, afin que le bloc d'agarose contenant la méduse soit immergé et ne sèche pas pendant l'expérience (figure 4.18). L'ensemble est placé au réfrigérateur, à 15°C. Cette température est suffisamment basse pour freiner le développement de bactéries, qui à plus haute température attaquent la méduse immobilisée dans l'agarose, et suffisamment haute pour placer la méduse dans des conditions de température normales (la méduse *Aurelia aurita* peut vivre dans des eaux de mer de températures variées, de 10 à 30°C [96]). Comme nous l'avons vu au paragraphe précédent, les paramètres de l'appareil de compression sont ajustés afin de simuler la rapidité des contractions musculaires, d'imposer à la méduse une réduction de diamètre de l'ordre de 10%, et d'exercer une compression toutes les 2 secondes. L'appareil comprime l'agarose, et donc la méduse, pendant toute la nuit.



**Figure 4.19** – Schéma du bloc d'agarose, contenant une méduse juvénile, et destiné à être placé entre les plaques de l'appareil de compression. Les dimensions du bloc d'agarose sont indiquées.

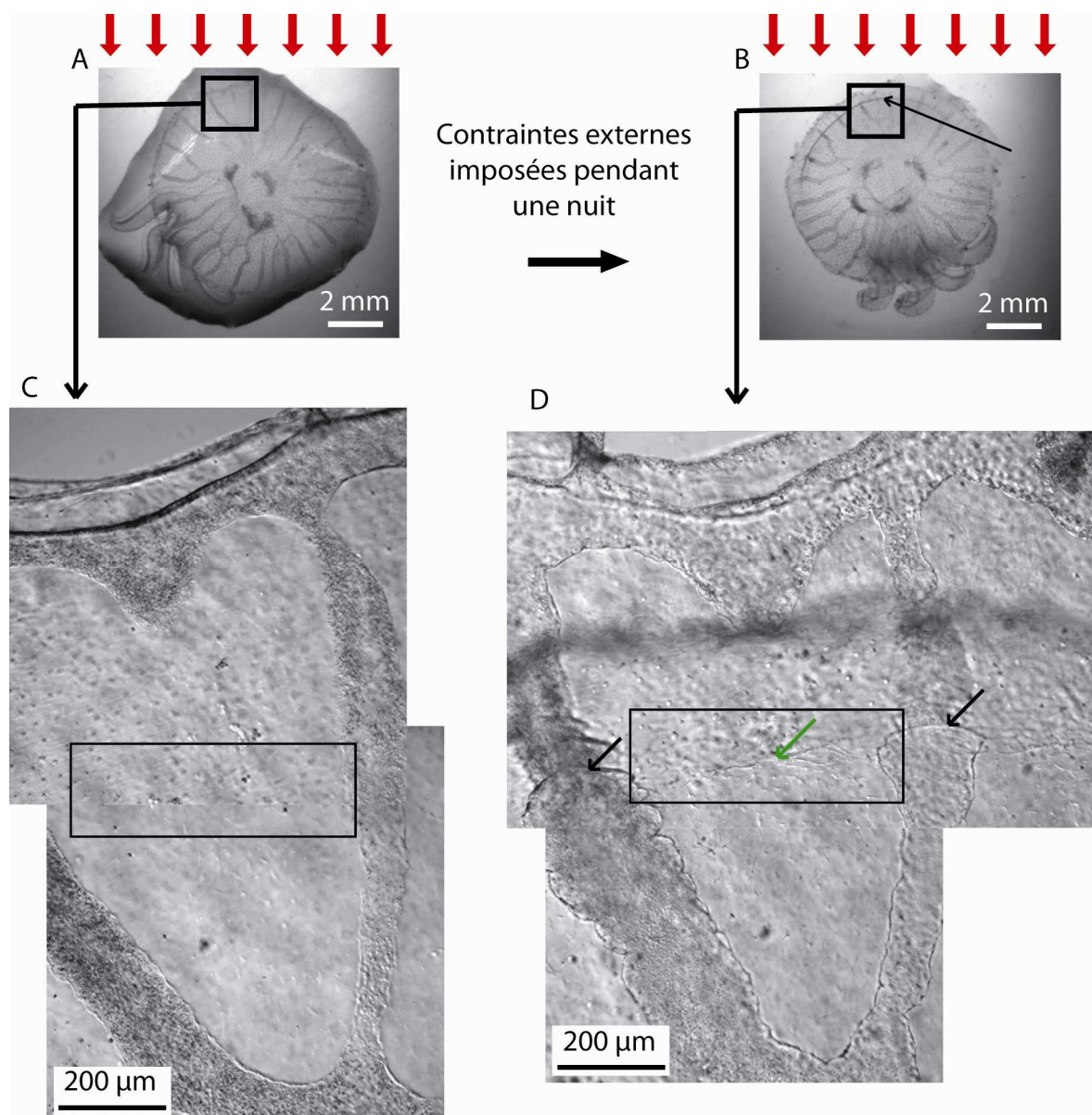
Le lendemain, le bloc d'agarose est brisé avec précaution, dans l'anesthésiant, et la méduse est retirée délicatement. Ses tissus ne sont pas abîmés par l'agarose. Nous prenons une image globale de la méduse, et de son réseau de canaux avec la loupe binoculaire, équipée de la

caméra CCD. Nous prenons également des images plus précises de son réseau de canaux et de l'endoderme avec le microscope à contraste interférentiel différentiel muni de l'objectif 10X, et équipé de la caméra CCD haute résolution. Nous visualisons plus en détail les zones où l'endoderme a été comprimé avec le microscope à contraste interférentiel différentiel muni de l'objectif 20X, et prenons des images avec la caméra CCD haute résolution. Nous plaçons ensuite la méduse dans un b cher d'eau de mer, et vérifions que la méduse est bien vivante, et se met à nager à nouveau.

#### **4.3.3. Résultats**

Nous avons réalisé l'expérience de compression sur une cinquantaine de méduses, afin de mettre au point le protocole décrit précédemment. Puis, le protocole ayant été mis au point, nous avons répété l'expérience sur une dizaine de méduses. Nous présentons ici les résultats d'une expérience typique. Une méduse juvénile est placée dans l'agarose, est comprimée pendant toute une nuit, et est observée avant et après les contraintes de compression, en suivant le protocole décrit précédemment.

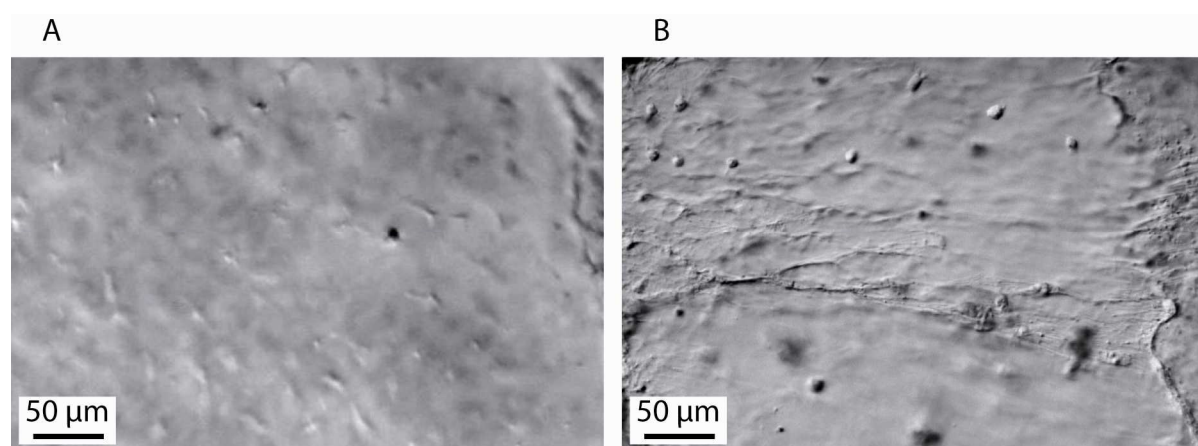
Nous observons que tous les tissus de la méduse sont comprimés (peau, endoderme, canaux, mésoglée...). Ces compressions ne se répartissent pas de manière homogène dans la méduse, et se concentrent sur la région de l'ombrelle placée le plus près de la plaque mobile, au voisinage du bord de l'ombrelle. La figure 4.20 présente des images d'une méduse juvénile avant et après l'exercice des contraintes de compression pendant toute une nuit. Ces images ont été prises à la loupe binoculaire, et au microscope à contraste interférentiel différentiel à l'objectif 10X. La direction des contraintes exercées est indiquée par des flèches rouges. Nous observons à la loupe binoculaire qu'à l'issue de l'expérience, la peau de la méduse et la mésoglée ont été localement comprimées (dans une zone indiquée par la flèche noire sur la figure 4.20 B). Au microscope, il apparaît qu'à l'issue de l'expérience, les canaux ont été comprimés : des pincements sont observés dans la direction de la compression (indiqués par des flèches noires sur la figure 4.20 D). L'endoderme a également été comprimé, dans la zone indiquée par la flèche verte sur la figure 4.20 D.



**Figure 4.20** – Visualisation d’une méduse avant et après l’expérience de compression. Visualisation à la loupe binoculaire (A et B), et en microscopie à contraste interférentiel différentiel muni de l’objectif 10X (C et D). En haut à gauche (A) : visualisation globale de la méduse avant les compressions. En haut à droite (B) : visualisation globale de la méduse après les compressions. En bas à gauche (C) : visualisation du bord de l’ombrelle de la méduse avant les compressions. En bas à droite (D) : visualisation du bord de l’ombrelle de la méduse après les compressions.

La figure 4.21 A (respectivement 4.21 B) correspond à une vue détaillée de la zone encadrée sur la figure 4.20 A (respectivement 4.20 B). Cette zone encadrée est la zone où les contraintes se sont accumulées dans l’endoderme, et où des modifications des structures cellulaires sont visibles. L’image de la figure 4.21 A est moins nette que celle de la figure 4.21 B, car la première a été prise avec l’objectif 10X, et la seconde avec l’objectif 20X. Nous

observons sur la zone comprimée que les cellules de l'endoderme se sont alignées perpendiculairement à la direction de la contrainte, se sont rapprochées les unes des autres, et que des grumeaux sont apparus dans ces cellules. La morphologie de ces cellules ressemble beaucoup à celle des cellules de l'endoderme en cours de différenciation en cellules de canal, notamment l'apparition des grumeaux, correspondant aux vésicules observées en microscopie électronique à transmission (chapitre 3, paragraphes 3.1.5., 3.2.1. et 3.2.2.). Nous avons vérifié (expérience témoin) que des méduses placées dans l'agarose pendant une nuit en suivant le protocole présenté précédemment (paragraphe 4.3.2.), mais qui ne subissent pas de contraintes de compression, sont vivantes à l'issue de l'expérience et ne présentent aucune modification de leurs tissus. Chez ces méduses, bien que nous n'ayons pas réalisé d'images détaillées de toute la surface de leur endoderme, nous n'avons pas observé de compression des canaux, ni d'empilement important des cellules de l'endoderme, comme il y en a chez les méduses ayant subi les expériences de compressions.



**Figure 4.21** – Visualisation détaillée de la zone de l'endoderme encadrée sur la figure 4.20, avant et après l'expérience de compression. Visualisation en microscopie à contraste interférentiel différentiel muni de l'objectif 10X (A) et 20X (B). À gauche (A) : visualisation de la zone avant les compressions. À droite (B) : visualisation de la zone après les compressions.

La figure 4.22 présente une comparaison entre différentes images des cellules de l'endoderme dans les zones comprimées après avoir subi les contraintes de compression externes pendant une nuit, et plusieurs images des cellules de l'endoderme en cours de différenciation en cellules de canal au milieu de l'endoderme. Ces dernières sont issues des expériences de suivi de l'apparition d'un canal au milieu de l'endoderme (chapitre 3, paragraphe 3.2.2.). Les images présentées dans la figure 4.22 B ont été prises (de haut en bas) 2, 5, et 7 jour après le début du suivi de l'apparition du canal, et correspondent donc à différents stades du processus de différenciation cellulaire. Les images présentées figure 4.22 A ont toutes été prises après avoir exercé des contraintes dans l'endoderme pendant une nuit, dans la zone de fortes contraintes. Nous pouvons observer la similarité des morphologies de ces cellules (cellules

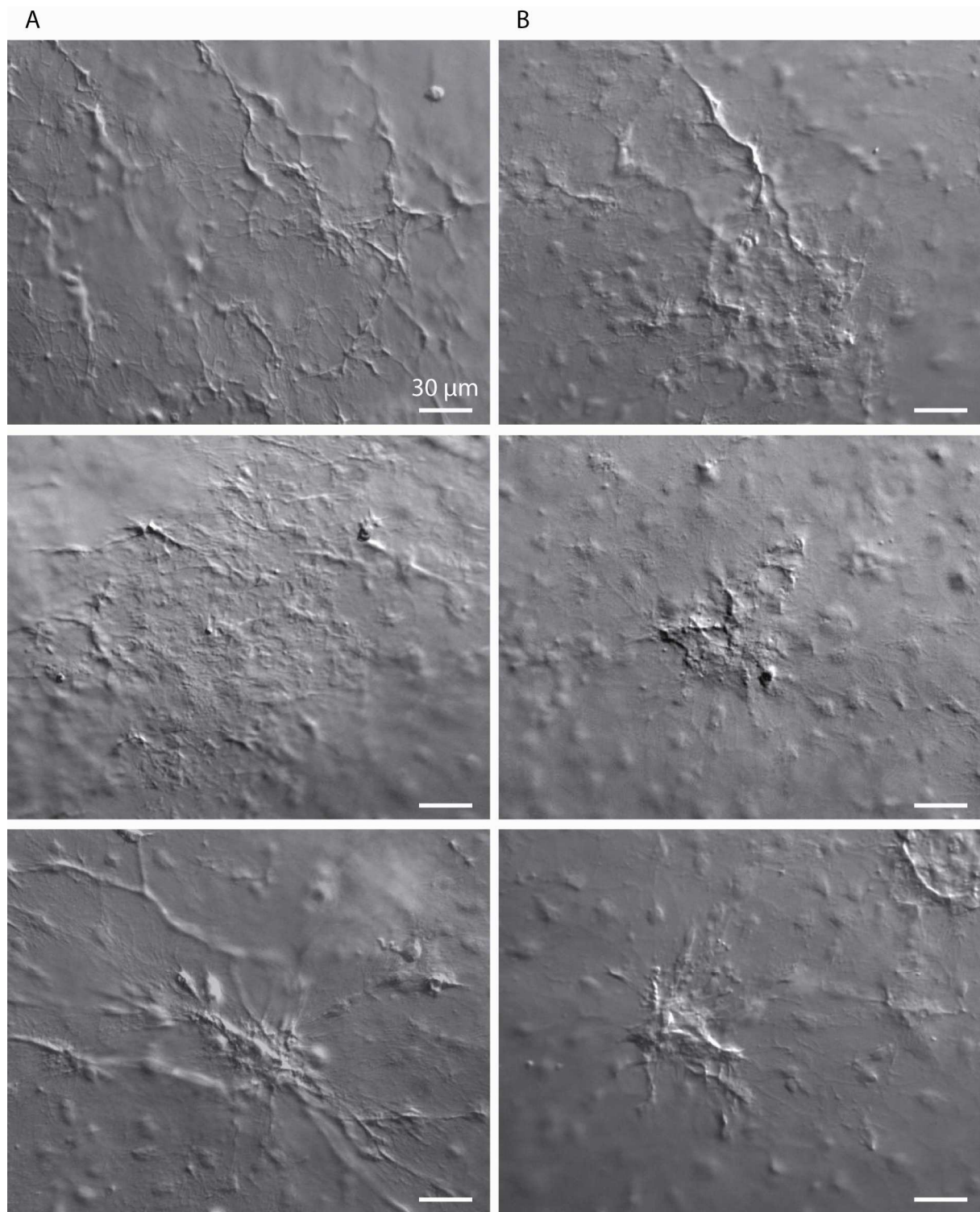
très proches les unes des autres, s'empilant les unes sur les autres, et apparition de grumeaux dans leur cytoplasme). Ainsi, il semble que de fortes contraintes externes exercées dans l'endoderme permettent de former en une nuit des structures cellulaires morphologiquement proches de celles observées *in vivo*, à différents stades du processus progressif de formation d'un canal dans l'endoderme.

Nous avons suivi pendant plusieurs jours les méduses qui ont été comprimées pendant une nuit, afin de voir si les cellules de l'endoderme dans les zones comprimées, présentant des grumeaux, se sont ensuite différenciées en cellules de canal. Nous n'avons pas observé de différenciation de ces cellules : elles ont progressivement perdu leurs grumeaux et se sont éloignées les unes des autres. Notons que lorsque nous avons réalisé les expériences de suivi *in vivo* de l'apparition des canaux au milieu de l'endoderme, nous avons observé que certaines cellules de l'endoderme semblaient s'engager dans un processus de différenciation (elles présentaient des grumeaux dans leur cytoplasme et étaient proches les unes des autres), puis par la suite semblaient renoncer à cette différenciation (les grumeaux disparaissaient et les cellules s'éloignaient les unes des autres). Il est possible que si les contraintes de compression externes ne sont pas suffisamment importantes, et exercées pendant suffisamment longtemps, les cellules de l'endoderme ne se différencient pas en cellules de canal. Il est également possible que les contraintes de compression seules ne suffisent pas à induire la différenciation des cellules de l'endoderme en cellules de canal, et que la présence de facteurs de croissance, induits par des changements métaboliques locaux, soit indispensable pour permettre l'apparition d'un canal. Ces facteurs de croissance pourraient être du même type que les analogues aux 'Vascular Endothelial Growth Factor' (VEGF) et 'Vascular Endothelial Growth Factor Receptor' (VEGFR) découverts dans la méduse *Podocoryne carnea* [140].

Nous avons par conséquent essayé d'exercer les contraintes dans les méduses pendant plus longtemps, pendant plusieurs jours. Mais nous n'avons pas réussi à maintenir les méduses vivantes pendant ce temps. Elles finissaient par se désagréger dans l'agarose, et par être digérées par des bactéries. Une solution pourrait être de réaliser l'expérience en milieu totalement stérile, et de sortir chaque jour la méduse pendant plusieurs heures de l'agarose, avant de la remettre dans l'agarose dans la même position, afin de ne pas la stresser en continu, pour éviter qu'elle meure. Il serait également intéressant de visualiser en microscopie électronique à transmission la structure des cellules de l'endoderme dans les zones comprimées, et de la comparer aux cellules à l'extrémité d'un canal en croissance.

Toutefois, les expériences réalisées montrent que des contraintes de compression dans l'endoderme induisent un rapprochement des cellules de l'endoderme et une apparition de grumeaux dans leur cytoplasme, qui correspondent aux aspects morphologiques visibles en microscopie optique des cellules de l'endoderme qui commencent à se différencier en cellules de canal. Ces résultats vont donc dans le sens d'une différenciation des cellules de l'endoderme en cellules de canal sous contrainte de compression, même s'ils ne permettent pas pour l'instant de valider cette hypothèse avec certitude.



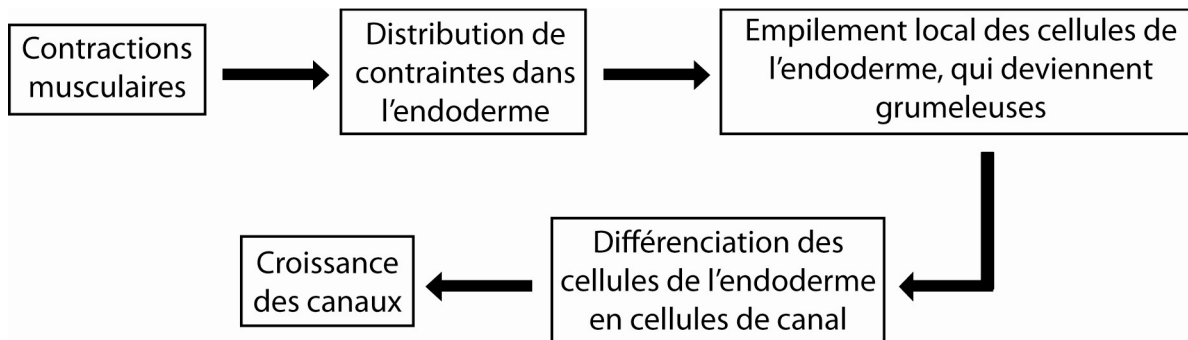


**Figure 4.22** – *Comparaison entre différentes images des cellules de l'endoderme dans les zones comprimées après avoir subi les contraintes de compression externes pendant une nuit (images de la colonne A, à gauche) et plusieurs images des cellules de l'endoderme en différenciation en cellules de canal au milieu de l'endoderme (images de la colonne B, à droite).*

## 4.4. Conclusion et perspectives du chapitre

### 4.4.1. Conclusion : un processus d'auto-organisation

Les expériences réalisées (paragraphe 4.1. et chapitre 2) ont montré que les contractions musculaires compriment et déforment les tissus (canaux, endoderme, mésoglée). Les canaux, en se pinçant, permettent de relaxer localement ces contraintes de compression. Comme le montrent les simulations numériques (paragraphe 4.2.), ces dernières se concentrent alors dans l'endoderme, à l'extrémité des canaux en croissance. Elles semblent contribuer à l'empilement et à la différenciation des cellules de l'endoderme, préalables à la croissance des canaux, comme le suggèrent les expériences de compressions externes (paragraphe 4.3.), ainsi que les conclusions du chapitre 3. La figure suivante (figure 4.23) schématise ce processus.



**Figure 4.23** – Schéma du processus liant les contractions musculaires à la croissance des canaux.

Ainsi, la croissance d'un canal dans l'endoderme permet de relaxer les contraintes de compression induites par les contractions musculaires. Il est intéressant de noter que les canaux du système gastrovasculaire, qui permettent de distribuer les nutriments dans l'ombrelle de la méduse, alimentent notamment les cellules musculaires, qui sont les plus grosses consommatrices d'énergie [9,16]; le fait que les canaux soient beaucoup plus proches de la sous-ombrelle, sur laquelle sont situées les fibres musculaires, que de l'ex-ombrelle, va dans ce sens [9,16]. Dès lors, il apparaît que les contractions musculaires induisent des contraintes dans l'endoderme, favorisant la croissance des canaux, qui permettent en retour d'alimenter les muscles. Il semble que, comme souvent dans le vivant, nous soyons en présence d'un système bouclé : le système gastrovasculaire permet aux muscles de fonctionner, et les muscles, en retour, lorsqu'ils fonctionnent, permettent au système gastrovasculaire de se développer. Le fonctionnement des muscles et du système gastrovasculaire est intimement lié à leur développement.



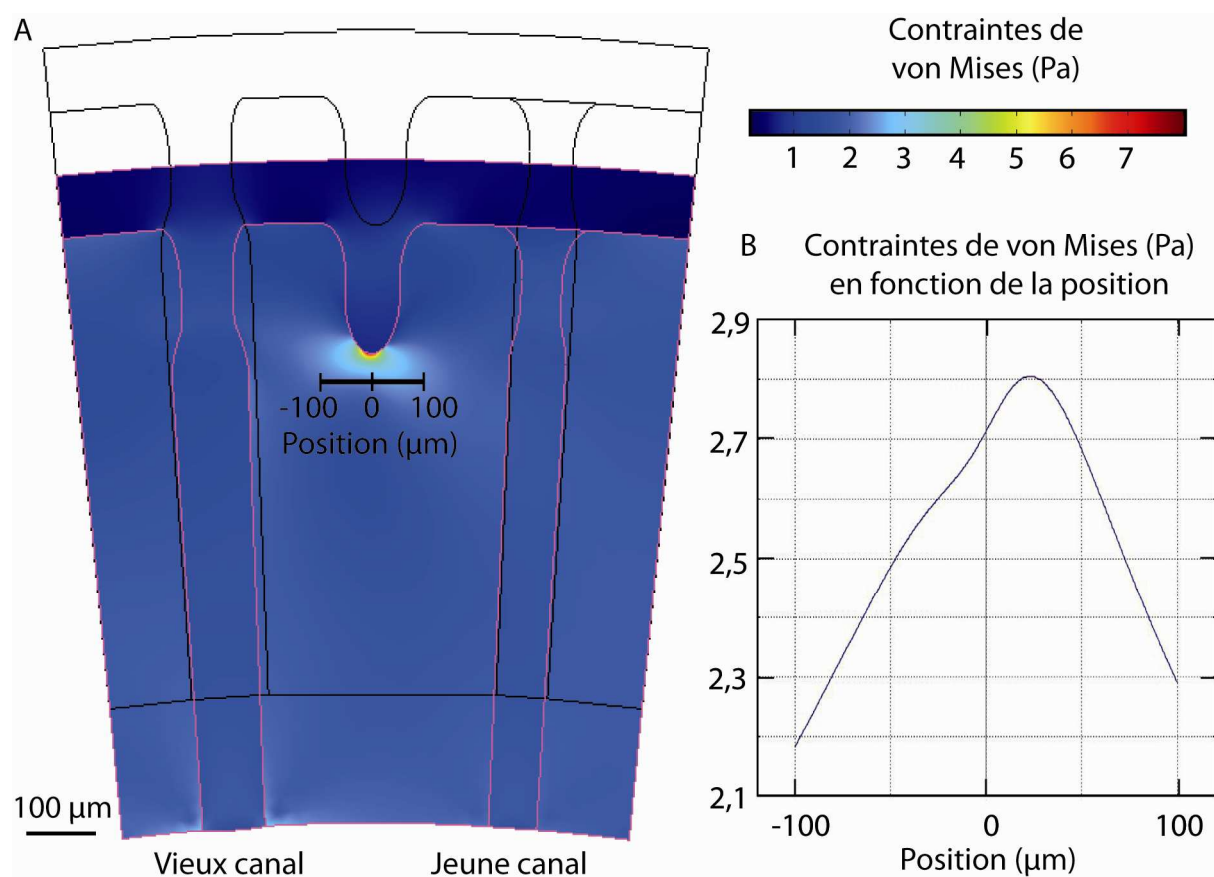
Ce processus permet à ces organes de s'auto-organiser, jusqu'à atteindre un état stable. Comme nous l'avons montré, les vieux canaux relaxent plus que les jeunes les contraintes de compression : les canaux, après avoir grandi, vieillissent, s'élargissent, et peuvent de plus en plus facilement se pincer et relaxer les contraintes ; et ce, vraisemblablement, jusqu'à ce que la méduse atteigne un stade où les contraintes dans l'endoderme sont insuffisantes pour permettre la différenciation cellulaire. Ce stade correspond sans doute au stade adulte, stade où on observe un arrêt de la croissance de l'ombrelle et de l'apparition de nouveaux canaux [133].

#### **4.4.2. Perspectives : vers un modèle de croissance**

Nos expériences montrent qu'un canal croît dans l'endoderme par différenciation des cellules de l'endoderme en cellules de canal et suggèrent que le canal croît là où les contraintes dans l'endoderme induites par les contractions musculaires sont les plus importantes. Par ailleurs, nous avons soulevé au chapitre 1 le problème de la direction de croissance d'un nouveau canal. Ce dernier apparaît sur le bord de l'ombrelle, croît vers son centre, puis se connecte au plus jeune canal déjà formé. Ce processus est à l'origine de la forme fractale du système gastrovasculaire. Afin de comprendre plus en détail les paramètres qui orientent la direction de croissance d'un nouveau canal, il serait intéressant de développer le modèle numérique présenté au paragraphe 4.2, et de modéliser la croissance du canal dans l'endoderme au cours du temps.

Quelques expériences préliminaires nous donnent des éléments pour la mise en place de ce modèle de croissance. L'asymétrie de la direction de croissance d'un nouveau canal est vraisemblablement directement liée à l'asymétrie de son environnement mécanique. Nous avons montré qu'un nouveau canal croît en effet entre un jeune canal peu déformable, et un vieux canal plus déformable (figures 4.6, 4.7 et 4.8). Les contraintes de compression musculaires sont donc asymétriquement relaxées autour du canal en croissance. Si le canal croît effectivement là où les contraintes sont les plus fortes, il est envisageable que le canal se connecte préférentiellement au jeune canal, qui relaxe moins les contraintes que le vieux.

Nous avons réalisé des simulations numériques sous Comsol analogues à celles présentées au paragraphe 4.2, mais dans lesquelles les canaux radiaux encadrant le canal en croissance ont des propriétés mécaniques différentes (figure 4.24). Le vieux canal (situé à gauche sur la figure 4.24 A) est plus déformable que le jeune canal (situé à droite sur la figure 4.24 A) : l'endoderme a un module de Young  $E_{\text{endo}} = 100 \text{ Pa}$ , le vieux canal  $E_{\text{vieux canal}} = 10 \text{ Pa}$ , le jeune canal  $E_{\text{jeune canal}} = 30 \text{ Pa}$ . Nous pouvons observer que les contraintes de compression sont toujours maximales à l'extrémité du canal en croissance, mais qu'elles sont légèrement asymétriques : si nous traçons les contraintes de von Mises en fonction de la position le long de la ligne noire représentée sur la figure 4.24 A, nous observons que ces contraintes sont légèrement décentrées, et plus importantes du côté du jeune canal que du vieux (figure 4.24 B).



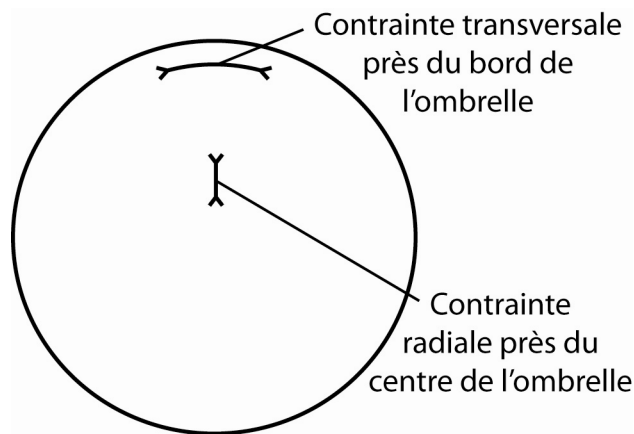
**Figure 4.24** – Résultat du modèle réalisé sous Comsol simulant une contraction musculaire, lorsque les propriétés mécaniques sont différentes entre vieux et jeunes canaux radiaux. À gauche (A) : répartition des contraintes de von Mises dans la tranche d'ombrelle à l'issue de la contraction. À droite (B) : contraintes de von Mises en fonction de la position le long de la ligne noire représentée sur la figure 4.24 A.

Il est toutefois difficile de conclure à ce stade, car si nous nous plaçons exactement à la pointe du canal en croissance, les contraintes sont très localement plus importantes du côté du jeune canal. Dès lors, il est nécessaire de savoir à quel seuil de contraintes les cellules de l'endoderme commenceraient à se différencier, afin de déterminer la zone de l'endoderme qui se différencierait. Nous pourrions faire alors croître numériquement le canal en attribuant numériquement à cette zone les propriétés mécaniques d'un canal. Une nouvelle répartition des contraintes serait alors déterminée. Ainsi, nous pourrions simuler la croissance progressive d'un canal dans l'endoderme et visualiser sa direction de croissance.

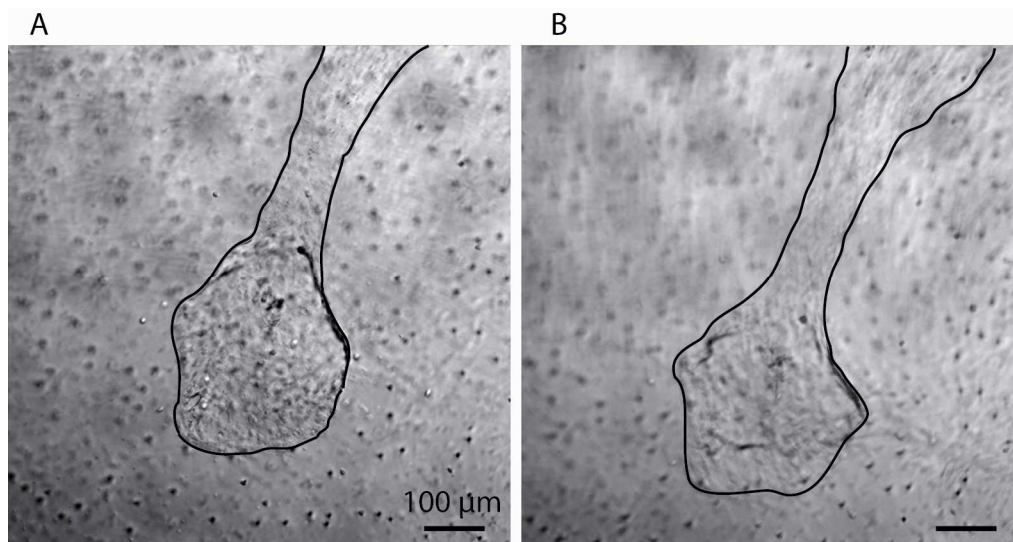
Il est important de noter que si l'asymétrie de l'environnement mécanique pourrait expliquer qu'un canal en croissance croît de façon asymétrique, et se dirige préférentiellement vers les jeunes canaux plutôt que vers les vieux, cela n'explique pas pourquoi ce canal en croissance se connecte ensuite au jeune canal. En effet, dans un processus de croissance par relaxation de contraintes, pour que des reconnections aient lieu, il faut que les contraintes soient dans

plusieurs directions [34]. Les contraintes de compression ne seraient donc pas seulement transversales, mais également radiales. Nous pensons que les contraintes de compression lors d'une contraction musculaire sont essentiellement transversales près du bord de l'ombrelle (comme nous l'avons vu précédemment), ce qui permet d'initier une croissance des canaux perpendiculairement à ces contraintes, donc radialement. Nous suggérons également que ces contraintes sont principalement radiales près du centre de l'ombrelle, ce qui permet au canal qui commençait à grandir radialement, et à s'orienter dans la direction du jeune canal, de croître de façon transversale près du centre de l'ombrelle, et finalement de se connecter au jeune canal. Comme représenté sur la figure 4.25, l'orientation des contraintes de compression lors d'une contraction musculaire serait transversale près du bord de l'ombrelle et radiale près de son centre.

Des observations des directions de pincement des canaux confirment cette hypothèse. Comme nous l'avons décrit au paragraphe 4.1.3., nous avons observé que les canaux radiaux se pincement de manière transversale près du bord de l'ombrelle, ce qui correspond à des relaxations de contraintes de compression transversales. Par ailleurs, nous avons observé que près du centre de l'ombrelle, les canaux se pincement de manière radiale, ce qui correspond à des relaxations de contraintes de compression radiales. La figure 4.26 montre le pincement de l'extrémité d'un canal en croissance, près du centre de l'ombrelle. Sur cette figure, le centre de l'ombrelle est situé vers le bas, légèrement à gauche. Le contour du canal est surligné en noir. Nous observons que le canal s'élargit à son extrémité, et que cette extrémité se pince dans la direction radiale (donc perpendiculairement à la direction de pincement observée près du bord de l'ombrelle). Ainsi, si un canal croît là où les contraintes dans l'endoderme sont les plus fortes, il croît perpendiculairement aux directions des contraintes de compression. Dès lors, il grandit de façon radiale près du bord de l'ombrelle, puis s'élargit, tourne et grandit de façon transversale près du centre de l'ombrelle, avant de se connecter aux canaux existants. Ainsi, dans notre modèle numérique de croissance, il faudrait intégrer le fait que près du centre, les contraintes radiales sont plus fortes. Cela vient du fait que le centre de la méduse, constitué notamment des poches gastriques, résiste à la compression, et que dès lors les tissus de l'ombrelle appuient dessus lors d'une compression. Pour prendre en compte cet effet, nous pourrions intégrer au modèle de 'tranche' d'ombrelle un domaine un peu plus rigide vers son centre.



**Figure 4.25** – Schéma des directions des contraintes de compression dans l'ombrelle d'une méduse, lors de sa contraction.



**Figure 4.26** – Extrémité d'un canal en croissance au voisinage du centre de l'ombrelle d'une méduse juvénile, au repos et en contraction. Visualisation en microscopie à contraste interférentiel différentiel, avec l'objectif 10X. À gauche (A): extrémité du canal, ombrelle au repos. À droite (B): extrémité du canal, ombrelle en contraction.

En complément de ce modèle de croissance, il serait intéressant de développer un modèle 3D. Benjamin Mauroy a commencé une modélisation de la contraction globale d'une méduse entière, afin de visualiser la répartition des contraintes. Les résultats préliminaires montrent que si le bord de l'ombrelle plie et ondule lors d'une contraction, cette déformation ne suffit pas à relaxer totalement les contraintes de compression, qui s'accumulent alors dans l'endoderme. De plus, il apparaît qu'en l'absence de canaux en croissance, les contraintes dans l'endoderme sont plus importantes au milieu de l'endoderme, entre les canaux déjà

existants. Ce travail, initié tout récemment, sera poursuivi par la suite. En parallèle, Philippe Dantan a commencé à travailler sur un modèle 3D d'une tranche d'ombrelle, afin de prendre en compte la structure tubulaire des canaux, la présence de la mésoglée, ainsi que la circulation d'eau dans les canaux. Il a simulé une contraction musculaire et observé la répartition résultante des contraintes dans l'endoderme. Les résultats préliminaires montrent que, comme dans le modèle 2D, les contraintes sont maximales dans l'endoderme, à l'extrémité du canal en croissance. Dans le futur, il serait envisageable de développer ce type de modèle avec des canaux de formes et de rigidités variables, afin de visualiser l'asymétrie de la répartition des contraintes dans l'endoderme qui en découle, et qui pourrait être mise en rapport avec la direction de croissance.

Par ailleurs, si nos expériences vont dans le sens d'une différenciation cellulaire des cellules de l'endoderme induites par les contractions musculaires, il serait intéressant, dans le futur, de consolider cette hypothèse par des expériences complémentaires. Comme mentionné dans le paragraphe 4.3.3., il pourrait être envisageable d'améliorer l'expérience de compressions externes pour maintenir la méduse plus longtemps vivante dans l'agarose, afin de pouvoir poursuivre l'expérience jusqu'à l'apparition de canaux dans l'endoderme induite par les contraintes. Il serait également intéressant de visualiser en microscopie électronique à transmission la structure des cellules de l'endoderme dans les zones comprimées, et de la comparer aux cellules à l'extrémité d'un canal en croissance. Par ailleurs, il pourrait être envisageable d'isoler les cellules de l'endoderme et de leur appliquer, *in vitro*, à l'échelle cellulaire, des contraintes de compression, et d'observer leur éventuelle différenciation en cellules de canal.

## Conclusion et perspectives

Dans ce travail de thèse, consacré à la morphogenèse du réseau gastrovasculaire de la méduse *Aurelia aurita*, nous avons étudié le rôle des propriétés rhéologiques des tissus et des contraintes mécaniques dans la morphogenèse, ainsi que les processus cellulaires associés à la croissance des canaux du système gastrovasculaire.

Les études conduites qui ont été présentées dans ce manuscrit ont été exposées, dans une large mesure, en suivant le déroulement chronologique du travail conduit.

Nous avons ainsi décrit dans le premier chapitre les débuts de notre étude. Nous avons initié nos recherches par une étude bibliographique, afin de connaître l'anatomie de la méduse et les principales étapes de sa croissance, et plus particulièrement de son système gastrovasculaire. Parallèlement à cette étude, et en collaboration avec la Cité de la Mer à Cherbourg, nous avons développé un système d'élevage des méduses au laboratoire. À la lumière des études antérieures, nous avons alors pu poursuivre au laboratoire les observations des différentes étapes de la croissance des canaux du système gastrovasculaire, initiées par Annemiek Cornelissen et Vincent Fleury à la Cité de la Mer de Cherbourg. Il est apparu que les tissus entourant les canaux, et par conséquent susceptibles de les guider mécaniquement dans leur croissance, étaient la mésoglée, l'endoderme, ainsi que les muscles. Nous avons donc cherché à étudier les propriétés mécaniques ainsi que la structure de ces différents tissus, en lien avec la croissance du système gastrovasculaire.

Nous avons commencé par étudier la mésoglée, et avons présenté en détail cette étude, qui a été publiée, dans le second chapitre. Nous avons étudié les propriétés rhéologiques de la mésoglée aux échelles macroscopiques et microscopiques, par des expériences de macro- et de microrhéologie. Nous avons également visualisé sa structure fibreuse en microscopie optique à contraste interférentiel différentiel, ainsi qu'en microscopie électronique à balayage. L'organisation et l'architecture fibreuse de la mésoglée ont pu être mises en rapport avec ses propriétés rhéologiques, aux différentes échelles, macroscopique comme microscopique. À la lumière des résultats expérimentaux obtenus, la mésoglée ne semble pas guider à elle seule la morphogenèse gastrovasculaire. En revanche, les expériences menées nous ont permis d'observer et d'étudier en détail un phénomène intéressant de vieillissement de la mésoglée au cours du développement de la méduse, et qui semble être en lien avec les contraintes physiques subies par cette dernière lors des contractions musculaires.

Après avoir étudié la mésoglée, nous nous sommes intéressé à l'endoderme, et avons exposé les résultats des expériences réalisées dans le troisième chapitre. Nous avons observé que les canaux grandissaient dans l'endoderme, et il nous a semblé important de comprendre comment s'effectuait cette croissance, afin de pouvoir comprendre par la suite comment un canal pouvait être guidé mécaniquement dans sa croissance. Si la structure des canaux est relativement connue, celle de l'endoderme, et notamment de sa jonction avec les canaux, ainsi que les processus de croissance des canaux dans l'endoderme n'ont, à notre connaissance, pas été décrits. Nous avons donc étudié, d'un point de vue statique, la structure de l'endoderme et

de sa jonction aux canaux, par visualisation *in vivo* en microscopie optique à contraste interférentiel différentiel et à fluorescence, et par observations d'échantillons en microscopie électronique à balayage et à transmission. D'un point de vue dynamique, nous avons suivi *in vivo*, en microscopie à contraste interférentiel différentiel, la croissance d'un canal dans l'endoderme, ainsi que l'apparition d'un morceau de canal au milieu de l'endoderme. Les résultats combinés de ces différentes expériences nous ont permis de proposer un scénario du processus de croissance d'un canal dans l'endoderme : à l'extrémité d'un canal en croissance, les cellules de l'endoderme s'empilent progressivement les unes sur les autres, et se différencient en cellules de canal.

Dans le dernier chapitre, nous nous sommes intéressé au rôle que peuvent jouer les contraintes induites par les contractions musculaires dans la croissance d'un canal. Nous avons commencé par décrire les contraintes et déformations subies par les différents tissus étudiés (canaux, endoderme, mésoglée) lors des contractions musculaires. Nous avons également présenté une expérience simple permettant une mesure qualitative des propriétés mécaniques de l'endoderme. Ces différentes observations, jointes à l'étude des propriétés rhéologiques de la mésoglée exposée au deuxième chapitre, nous ont permis de proposer un modèle numérique simple, permettant de simuler une contraction musculaire, et de visualiser la répartition des contraintes qu'elle induit. Nous avons observé que les contraintes de compression sont maximales à l'extrémité d'un canal en croissance, là où, comme nous l'avons exposé au troisième chapitre, les cellules de l'endoderme s'empilent les unes sur les autres et se différencient en cellules de canal. Nous avons alors cherché à déterminer si les contraintes de compression dans l'endoderme induites par les contractions musculaires ne favorisaient pas l'empilement et la différenciation des cellules de l'endoderme, permettant la croissance d'un canal. Nous avons réalisé une expérience permettant d'exercer globalement des contraintes externes sur des méduses immobilisées. Les premiers résultats semblent montrer que là où les contraintes sont importantes, les cellules de l'endoderme s'empilent localement, et présentent des caractères morphologiques analogues à ceux des cellules de l'endoderme en début de différenciation. Les résultats de ces expériences, joints à ceux présentés dans les chapitres précédents, permettent de discuter du rôle joué par les contraintes induites par les contractions musculaires dans la morphogenèse du système gastrovasculaire, et de proposer un processus de croissance des canaux : les contractions musculaires induisent des contraintes de compression dans l'endoderme, responsables de l'empilement et de la différenciation de ces cellules en cellules de canal à l'extrémité des canaux, et conduisant à leur croissance. Dès lors, la direction de croissance d'un canal semble liée à son environnement physique, *via* la répartition spatiale des contraintes dans l'endoderme, qui dépend de la structure et des propriétés mécaniques des différents tissus qui l'entourent.

De nombreuses perspectives ont été évoquées dans ce manuscrit. Ainsi, nous avons exposé dans le quatrième chapitre plusieurs pistes d'amélioration du modèle numérique : en collaboration avec Benjamin Mauroy et Philippe Dantan, nous avons commencé des simulations en 3D, permettant de mieux modéliser la structure des tissus, et leurs déformations. Il serait également très intéressant de modéliser la dynamique de croissance d'un canal dans l'endoderme. Ce modèle numérique de croissance pourrait être validé par des



expériences de suivi, au cours du temps, de la croissance de nombreuses méduses et de leurs canaux, associées à la quantification de la vitesse et de la direction de croissance des différents tissus. Nous avons par ailleurs proposé dans le quatrième chapitre des améliorations de l'expérience de compressions externes, ainsi que des expériences complémentaires, afin d'étayer la thèse d'un empilement et d'une différenciation des cellules de l'endoderme sous contraintes. Enfin, dans le futur sont envisagées des expériences de biologie moléculaire, comme l'étude de l'expression des protéines de croissance impliquées dans la croissance du système gastrovasculaire de la méduse *Aurelia aurita*, afin de combiner études mécaniques et génétiques.

# Bibliographie

1. Abou B., and Gallet F. Probing a nonequilibrium Einstein relation in an aging colloidal glass. *Physical Review Letters*, 2004, vol. 93, n° 16, 160603.
2. Abou B., Gallet F., Monceau P., and Pottier N. Generalized Einstein Relation in an aging colloidal glass. *Physica A*, 2008, vol. 387, n° 14, 3410-3422.
3. Abou B., Gay C., Laurent B., Cardoso O., Voigt D., Peisker H., and Gorb S. Extensive collection of femtolitre pad secretion droplets in the beetle *Leptinotarsa decemlineata* allows nanolitre microrheology. *Journal of the Royal Society Interface*, 2010, vol. 7, n° 53, 1745-1752.
4. Al-Kilani A., Lorthois S., Nguyen T.H., Le Noble F., Cornelissen A.J.M., Unbekandt M., Boryskina O.P., Leroy L., and Fleury V. During vertebrate development, arteries exert a morphological control over the venous pattern through physical factors. *Physical Review E*, 2008, vol. 77, n° 5, 051912.
5. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., and Walter P. Molecular biology of the cell. New York: Garland Science, 2002, 1616 p.
6. Alexander R.M. Viscoelastic properties of mesoglea of jellyfish. *J. Exp. Biol.*, 1964, vol. 41, n° 2, 363-369.
7. Allieux-Guerin M., Icard-Arcizet D., Durieux C., Henon S., Gallet F., Mevel J.C., Masse M.J., Tramier M., and Coppey-Moisan M. Spatiotemporal Analysis of Cell Response to a Rigidity Gradient: A Quantitative Study Using Multiple Optical Tweezers. *Biophys. J.*, 2009, vol. 96, n° 1, 238-247.
8. Anderson P.A.V., and Schwab W.E. The organization and structure of nerve and muscle in the jellyfish *Cyanea capillata* (Coelenterata, Scyphozoa). *J. Morphol.*, 1981, vol. 170, n° 3, 383-399.
9. Arai M.N. A functional biology of Scyphozoa. London: Chapman & Hall, 1997, 336 p.
10. Baker E.L., Bonnacaze R.T., and Zamao M.H. Extracellular matrix stiffness and architecture govern intracellular rheology in cancer. *Biophys. J.*, 2009, vol. 97, n° 4, 1013-1021.
11. Basan M., Risler T., Joanny J.F., Sastre-Garau X., and Prost J. Homeostatic competition drives tumor growth and metastasis nucleation. *HFSP Journal*, 2009, vol. 3, n° 4, 265-272.
12. Berking S. Generation of bilateran symmetry in Anthozoa: a model. *J. Theor. Biol.*, 2007, vol. 246, n° 3, 477-490.
13. Berking S., Czech N., Gerharz M., Herrmann K., Hoffmann U., Raifer H., Sekul G., Siefker B., Sommerei A., and Vedder F. A newly discovered oxidant defence system and its involvement in the development of *Aurelia aurita* (Scyphozoa, Cnidaria): reactive oxygen species and elemental iodine control medusa formation. *Int. J. Dev. Biol.*, 2005, vol. 49, n° 8, 969-976.
14. Berking S., and Herrmann K. Compartments in Scyphozoa. *Int. J. Dev. Biol.*, 2007, vol. 51, n° 3, 221-228.

15. Berrier A.L., and Yamada K.M. Cell-matrix adhesion. *J. Cell. Physiol.*, 2007, vol. 213, n° 3, 565-573.
16. Bhamrah H.S. and Juneja K. An introduction to Coelenterata. New Delhi: Anmol publications, 2001.
17. Boryskina O.P., Al-Kilani A., and Fleury V. Limb positioning and shear flows in tetrapods. *European Physical Journal - Applied Physics*, 2011, vol. 55, n° 2, 21101.
18. Bosch T.C.G. Why polyps regenerate and we don't: Toward a cellular and molecular framework for Hydra regeneration. *Dev. Biol.*, 2007, vol. 303, n° 2, 421-433.
19. Bosch T.C.G., and Khalturin K. Patterning and cell differentiation in Hydra: novel genes and the limits to conservation. *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne de Zoologie*, 2002, vol. 80, n° 10, 1670-1677.
20. Bouillon J., and Coppois G. Comparative-study of mesoglea of cnidarians. *Cahiers de Biologie Marine*, 1977, vol. 18, n° 3, 339-368.
21. Bourguine P. and Lesne A. Morphogenèse: l'origine des formes. Paris: Belin, 2006, 352 p.
22. Breedveld V., and Pine D.J. Microrheology as a tool for high-throughput screening. *Journal of Materials Science*, 2003, vol. 38, n° 22, 4461-4470.
23. Cardoso W.V., and Lu J.N. Regulation of early lung morphogenesis: questions, facts and controversies. *Development*, 2006, vol. 133, n° 9, 1611-1624.
24. Chapman D.M. Microanatomy of the bell rim of Aurelia aurita (Cnidaria: Scyphozoa). *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne de Zoologie*, 1999, vol. 77, n° 1, 34-46.
25. Chapman D.M. Development of the the tentacles and food groove in the jellyfish Aurelia aurita (Cnidaria: Scyphozoa). *Can. J. Zool.*, 2001, vol. 79, n° 4, 623-632.
26. Chapman G. The mesoglea of Pelagia noctiluca. *Q. J. Microsc. Sci.*, 1959, vol. 100, n° 4, 599-610.
27. Chapman G. Studies of the mesoglea of coelenterates .1. Histology and chemical properties. *Q. J. Microsc. Sci.*, 1953, vol. 94, n° 2, 155-176.
28. Cherepanov G.P. The propagation of cracks in a continuous medium. *Journal of Applied Mathematics and Mechanics*, 1967, vol. 31, 503-512.
29. Chernyshev A.V., and Isaeva V.V. Formation of chaotic patterns of the gastrovascular system in the ontogenesis of the medusa Aurelia aurita. *Russian Journal of Marine Biology*, 2002, vol. 28, n° 5, 347-351.
30. Clark E.A., and Brugge J.S. Integrins and signal - Transduction pathways - The road taken. *Science*, 1995, vol. 268, n° 5208, 233-239.
31. Clement R. Mophogenèse et développement pulmonaire. 214 p., Th D : Biophysique : Université Paris Diderot : 2011.
32. Colin R., Alsayed A.M., Castaing J.C., Goyal R., Hough L., and Abou B. Spatially heterogeneous dynamics in a thermosensitive soft suspension before and after the glass transition. *Soft Matter*, 2011, vol. 7, n° 9, 4504-4514.

33. Corson F., Adda-Bedia M., and Boudaoud A. In silico leaf venation networks: Growth and reorganization driven by mechanical forces. *J. Theor. Biol.*, 2009, vol. 259, n° 3, 440-448.
34. Couder Y., Pauchard L., Allain C., Adda-Bedia M., and Douady S. The leaf venation as formed in a tensorial field. *European Physical Journal B*, 2002, vol. 28, n° 2, 135-138.
35. Coussot P. and Grossiord J.L. Comprendre la rhéologie: de la circulation du sang à la prise du béton. Les Ulis: EDP Sciences, 2002, 224 p.
36. Cowin S.C. Tissue growth and remodeling. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 2004, vol. 6, 77-107.
37. Cui C., Yang X.S., Chuai M.L., Glazier J.A., and Weijer C.J. Analysis of tissue flow patterns during primitive streak formation in the chick embryo. *Dev. Biol.*, 2005, vol. 284, n° 1, 37-47.
38. Dabiri J.O., Colin S.P., and Costello J.H. Morphological diversity of medusan lineages constrained by animal-fluid interactions. *Exp. Biol.*, 2007, vol. 210, 1868-1873.
39. Daniels B.R., Hale C.M., Khatau S.B., Kusuma S., Dobrowsky T.M., Gerecht S., and Wirtz D. Differences in the microrheology of human embryonic stem cells and human induced pluripotent stem cells. *Biophys. J.*, 2010, vol. 99, n° 11, 3563-3570.
40. Dasgupta B.R., and Weitz D.A. Microrheology of cross-linked polyacrylamide networks. *Physical Review E*, 2005, vol. 71, n° 2.
41. Dellaire G., Eskiw C.H., Dehghani H., Ching R.W., and Bazett-Jones D.P. Mitotic accumulations of PML protein contribute to the re-establishment of PML nuclear bodies in G1. *J. Cell Sci.*, 2006, vol. 119, n° 6, 1034-1042.
42. Denton E.J. Buoyancy mechanisms of sea creatures. *Endeavour*, 1963, vol. 22, n° 008, 3-8.
43. Desprat N., Guirouy A., and Asnacios A. Microplates-based rheometer for a single living cell. *Rev. Sci. Instrum.*, 2006, vol. 77, n° 5, 055111.
44. Desprat N., Richert A., Simeon J., and Asnacios A. Creep function of a single living cell. *Biophys. J.*, 2005, vol. 88, n° 3, 2224-2233.
45. Desprat N., Supatto W., Pouille P.A., Beaurepaire E., and Farge E. Tissue deformation modulates twist expression to determine anterior midgut differentiation in *Drosophila* embryos. *Developmental Cell*, 2008, vol. 15, n° 3, 470-477.
46. Deutzmann R., Fowler S., Zhang X.M., Boone K., Dexter S., Boot-Handford R.P., Rachel R., and Sarras M.P. Molecular, biochemical and functional analysis of a novel and developmentally important fibrillar collagen (Hcol-I) in hydra. *Development*, 2000, vol. 127, n° 21, 4669-4680.
47. Discher D.E., Janmey P., and Wang Y.L. Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science*, 2005, vol. 310, n° 5751, 1139-1143.
48. Engler A.J., Griffin M.A., Sen S., Bonnetnann C.G., Sweeney H.L., and Discher D.E. Myotubes differentiate optimally on substrates with tissue-like stiffness: pathological implications for soft or stiff microenvironments. *J. Cell Biol.*, 2004, vol. 166, n° 6, 877-887.
49. Engler A.J., Sen S., Sweeney H.L., and Discher D.E. Matrix elasticity directs cell lineage specification. *Cell*, 2006, vol. 126, n° 4, 677-689.

50. Fabry B., Maksym G.N., Butler J.P., Glogauer M., Navajas D., and Fredberg J.J. Scaling the microrheology of living cells. *Physical Review Letters*, 2001, vol. 87, n° 14, 148102.
51. Farge E. Mechanical induction of twist in the *Drosophila* foregut/stomodaeal primordium. *Curr. Biol.*, 2003, vol. 13, n° 16, 1365-1377.
52. Fernandez R., Das P., Mirabet V., Moscardi E., Traas J., Verdeil J.L., Malandain G., and Godin C. Imaging plant growth in 4D: robust tissue reconstruction and lineaging at cell resolution. *Nature Methods*, 2010, vol. 7, n° 7, 547-553.
53. Fink J., Carpi N., Betz T., Bétard A., Chebah M., Azoune A., Bornens M., Sykes C., Fetler L., Cuvelier D., and Piel M. External forces control mitotic spindle positioning. *Nature Cell Biology*, 2011, vol. 13, 771-778.
54. Fleury V. Clarifying tetrapod embryogenesis, a physicist's point of view. *European Physical Journal - Applied Physics*, 2009, vol. 45, n° 3, 30101.
55. Fleury V., Gouyet J.F., and Leonetti M. Branching in nature. Les Ulis: EDP Sciences, 2001, 502 p.
56. Frank U., and Rinkevich B. Scyphozoan jellyfish's mesoglea supports attachment, spreading and migration of anthozoans' cells in vitro. *Cell Biol. Int.*, 1999, vol. 23, n° 4, 307-311.
57. Gambini C., Abou B., Ponton A., and Cornelissen A.J.M. Micro- and macrorheology of jellyfish extracellular matrix. *Biophys. J.*, 2012, vol. 102, n° 1, 1-9.
58. Geiger B., Spatz J.P., and Bershadsky A.D. Environmental sensing through focal adhesions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2009, vol. 10, n° 1, 21-33.
59. Gemmill J.F. Notes on food-capture and ciliation in the ephyrae of *Aurelia*. *Proceedings of the Royal Physical Society*, 1921, vol. 20, 222-225.
60. Gladfelt W.B. Structure and function of locomotory system of *Polyorchis montereyensis* (Cnidaria, Hydrozoa). *Helgolander Wissenschaftliche Meeresuntersuchungen*, 1972, vol. 23, n° 1, 38-79.
61. Gladfelter E.H. Circulation of fluids in the gastrovascular system of the reef coral *Acropora cervicornis*. *Biol. Bull.*, 1983, vol. 165, n° 3, 619-636.
62. Griffith A.A. The phenomenon of rupture and flow in solids. *Philosophical Transaction of the Royal Society*, 1921, vol. 221, 163-198.
63. Hamant O., Heisler M.G., Jonsson H., Krupinski P., Uyttewaal M., Bokov P., Corson F., Sahlin P., Boudaoud A., Meyerowitz E.M., Couder Y., and Traas J. Developmental Patterning by Mechanical Signals in *Arabidopsis*. *Science*, 2008, vol. 322, 1650-1655.
64. Holstein T.W., Hobmayer E., and Technau U. Cnidarians: an evolutionary conserved model system for regeneration ? *Dev. Dyn.*, 2003, vol. 226, n° 2, 257-267.
65. Horridge A. Observations on the nerve fibres of *Aurelia aurita*. *Q. J. Microsc. Sci.*, 1954, vol. 95, n° 1, 85-92.
66. Horridge G.A. The nerves and muscles of medusae. 1. Conduction in the nervous system of *Aurelia aurita* Lamarck. *J. Exp. Biol.*, 1954, vol. 31, n° 4, 594-600.

67. Hsu S., Jamieson A.M., and Blackwell J. Viscoelastic studies of extracellular matrix interactions in a model native collagen gel system. *Biorheology*, 1994, vol. 31, n° 1, 21-36.
68. Huisken J., Swoger J., Del Bene F., Wittbrodt J., and Stelzer E.H.K. Optical sectioning deep inside live embryos by selective plane illumination microscopy. *Science*, 2004, vol. 305, n° 5686, 1007-1009.
69. Hynes R.O. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, 2002, vol. 110, n° 6, 673-687.
70. Hynes R.O. The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science*, 2009, vol. 326, n° 5957, 1216-1219.
71. Icard-Arcizet D., Cardoso O., Richert A., and Henon S. Cell stiffening in response to external stress is correlated to actin recruitment. *Biophys. J.*, 2008, vol. 94, n° 7, 2906-2913.
72. Ingber D.E. Tensegrity-based mechanosensing from macro to micro. *Progress in Biophysics & Molecular Biology*, 2008, vol. 97, n° 2-3, 163-179.
73. Ingber D.E. Mechanical signalling and the cellular response to extracellular matrix in angiogenesis and cardiovascular physiology. *Circ. Res.*, 2002, vol. 91, n° 10, 877-887.
74. Ingber D.E. Cellular mechanotransduction: putting all the pieces together again. *FASEB J.*, 2006, vol. 20, n° 7, 811-827.
75. Ingber D.E., and Ing. Mechanical control of tissue morphogenesis during embryological development. *Int. J. Dev. Biol.*, 2006, vol. 50, n° 2-3, 255-266.
76. Iordan A., Duperray A., Gerard A., Grichine A., and Verdier C. Breakdown of cell-collagen networks through collagen remodeling. *Biorheology*, 2010, vol. 47, n° 5-6, 277-295.
77. Irwin G. Analysis of stresses and strains near the end of a crack traversing a plate. *Journal of Applied Mechanics*, 1957, vol. 24, 361-364.
78. Isaeva V.V., Chernyshev A.V., and Shkuratov D.Y. Quasi-fractal organization of the gastrovascular system of the jellyfish *Aurelia aurita*: order and chaos. *Biochemistry, biophysics and molecular biology*, 2001, vol. 377, 110-112.
79. Isogai S., Lawson N.D., Torrealday S., Horiguchi M., and Weinstein B.M. Angiogenic network formation in the developing vertebrate trunk. *Development*, 2003, vol. 130, n° 21, 5281-5290.
80. Khalturin K., Anton-Erxleben F., Sassmann S., Wittlieb J., Hemmrich G., and Bosch T.C.G. A Novel Gene Family Controls Species-Specific Morphological Traits in Hydra. *PLoS Biology*, 2008, vol. 6, n° 11, 2436-2449.
81. Khalturin K., Hemmrich G., Fraune S., Augustin R., and Bosch T.C.G. More than just orphans: are taxonomically-restricted genes important in evolution? *Trends Genet.*, 2009, vol. 25, n° 9, 404-413.
82. Kleinman H.K., Philp D., and Hoffman M.P. Role of the extracellular matrix in morphogenesis. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2003, vol. 14, n° 5, 526-532.
83. Knapp D.M., Barocas V.H., Moon A.G., Yoo K., Petzold L.R., and Tranquillo R.T. Rheology of reconstituted type I collagen gel in confined compression. *Journal of Rheology*, 1997, vol. 41, n° 5, 971-993.

84. Kondo S., and Miura T. Reaction-Diffusion Model as a Framework for Understanding Biological Pattern Formation. *Science*, 2010, vol. 329, n° 5999, 1616-1620.
85. Kraus Y.A. Morphomechanical programming of morphogenesis in Cnidarian embryos. *Int. J. Dev. Biol.*, 2006, vol. 50, n° 2-3, 267-275.
86. Kroiher M., Siefker B., and Berking S. Induction of segmentation in polyps of *Aurelia aurita* (Scyphozoa, Cnidaria) into medusae and formation of mirror-image medusa anlagen. *Int. J. Dev. Biol.*, 2000, vol. 44, n° 5, 485-490.
87. Laufs P., Jonak C., and Traas J. Cells and domains: two views of the shoot meristem in *Arabidopsis*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2012, vol. 36, n° 1-2, 33-45.
88. Le Digabel J., Ghibaudo M., Trichet L., Richert A., and Ladoux B. Microfabricated substrates as a tool to study cell mechanotransduction. *Med. Biol. Eng. Comput.*, 2010, vol. 48, n° 10, 965-976.
89. Le Noble F., Moyon D., Pardanaud L., Yuan L., Djonov V., Matthijsen R., Breant C., Fleury V., and Eichmann A. Flow regulates arterial-venous differentiation in the chick embryo yolk sac. *Development*, 2004, vol. 131, n° 2, 361-375.
90. Lecuit T., and Lenne P.F. Cell surface mechanics and the control of cell shape, tissue patterns and morphogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2007, vol. 8, n° 8, 633-644.
91. Lenhoff H.M., and Lenhoff S.G. Trembley's polyps. *Sci. Am.*, 1988, vol. 258, n° 4, 86-91.
92. Les secrets intimes de la belle *Aurelia*. Gérard Breton.  
<http://www.scienceaction.asso.fr/Archives-La-chronique-de-Gerard-BRETON-n%C2%B03---Les-secrets-intimes-de-la-belle-Aurelia---Avril-2006-86.htm>. 2012.
93. Leung L.Y., Tian D., Brangwynne C.P., Weitz D.A., and Tschumperlin D.J. A new microrheometric approach reveals individual and cooperative roles for TGF-beta 1 and IL-1 beta in fibroblast-mediated stiffening of collagen gels. *FASEB J.*, 2007, vol. 21, n° 9, 2064-2073.
94. Levental I., Georges P.C., and Janmey P.A. Soft biological materials and their impact on cell function. *Soft Matter*, 2007, vol. 3, n° 3, 299-306.
95. Litke L.L., and Low F.N. Fixative tonicity for scanning electron microscopy delicate chick embryos. *Am. J. Anat.*, 1977, vol. 148, n° 1, 121-127.
96. Lucas C.H. Reproduction and life history strategies of the common jellyfish *Aurelia aurita*, in relation to its ambient environment. *Hydrobiologia*, 2001, vol. 451, 229-246.
97. Lucitti J.L., Jones E.A.V., Huang C.Q., Chen J., Fraser S.E., and Dickinson M.E. Vascular remodeling of the mouse yolk sac requires hemodynamic force. *Development*, 2007, vol. 134, n° 18, 3317-3326.
98. Luengo-Oroz M.A., Ledesma-Carbayo M.J., Peyri  ras N., and Santos A. Image analysis for understanding embryo development: a bridge from microscopy to biological insights. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 2011, vol. 21, n° 5, 630-637.
99. Mackie G.O., and Meech R.W. Nerves in the endodermal canals of hydromedusae and their role in swimming inhibition. *Invert. Neurosci.*, 2008, vol. 8, 199-209.



100. MacKintosh F.C., and Schmidt C.F. Microrheology. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 1999, vol. 4, n° 4, 300-307.
101. Mason T.G. Estimating the viscoelastic moduli of complex fluids using the generalized Stokes-Einstein equation. *Rheologica Acta*, 2000, vol. 39, n° 4, 371-378.
102. Mason T.G., Gang H., and Weitz D.A. Rheology of complex fluids measured by dynamic light scattering. *Journal of Molecular Structure*, 1996, vol. 383, n° 1-3, 81-90.
103. Mason T.G., and Weitz D.A. Optical measurements of frequency-dependent linear viscoelastic moduli of complex fluids. *Physical Review Letters*, 1995, vol. 74, n° 7, 1250-1253.
104. Massiera G., Van Citters K.M., Biancaniello P.L., and Crocker J.C. Mechanics of single cells: rheology, time dependence, and fluctuations. *Biophys. J.*, 2007, vol. 93, n° 10, 3703-3713.
105. Mavrakakis M., Pourquie O., and Lecuit T. Lighting up developmental mechanisms: how fluorescence imaging heralded a new era. *Development*, 2010, vol. 137, n° 3, 373-387.
106. Megill W.M., Gosline J.M., and Blake R.W. The modulus of elasticity of fibrillin-containing elastic fibres in the mesoglea of the hydromedusa *Pollyorchis penicillatus*. *J. Exp. Biol.*, 2005, vol. 208, n° 20, 3819-3834.
107. Mitrossilis D, Fouchard J., Guiroy A., Desprat N., Rodriguez N., Fabry B., and Asnacios A. Single-cell response to stiffness exhibits muscle-like behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2009, vol. 106, n° 43, 18243-18248.
108. Mitrossilis D, Fouchard J., Pereira D., Postic F., Richert A., Saint-Jean M., and Asnacios A. Real-time single-cell response to stiffness. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2010, vol. 107, n° 38, 16518-16523.
109. Miura S., and Kimura S. Jellyfish mesoglea collagen - Characterization of molecules as  $\alpha 1$ - $\alpha 2$ - $\alpha 3$  heterotrimers. *J. Biol. Chem.*, 1985, vol. 260, n° 28, 5352-5356.
110. Moyon D., Pardanaud L., Yuan L., Breant C., and Eichmann A. Plasticity of endothelial cells during arterial-venous differentiation in the avian embryo. *Development*, 2001, vol. 128, n° 17, 3359-3370.
111. Murate M., Takahashilwanaga H., Kurosaki R., Takeda M., and Koizumi O. Scanning electron microscopy of endodermal sensory cells of *Hydra magnipapillata*. *Cell Tissue Res.*, 1996, vol. 283, n° 3, 455-459.
112. Nématocyste. <http://fr.wikipedia.org/wiki/Nématocyste>. 2012.
113. Nguyen T.H., Eichmann A., Le Noble F., and Fleury V. Dynamics of vascular branching morphogenesis: The effect of blood and tissue flow. *Physical Review E*, 2006, vol. 73, n° 6, 061907.
114. Olivier N., Luengo-Oroz M.A., Duloquin L., Faure E., Savy T., Veilleux I., Solinas X, Debarre D., Bourguine P., Santos A, Peyri  ras N., and Beaurepaire E. Cell lineage reconstruction of early zebrafish embryos using label-free nonlinear microscopy. *Science*, 2010, vol. 329, n° 5994, 967-971.
115. Oswald P. Rh  ophysique: Ou comment coule la matière. Paris: Belin, 2005, 603 p.
116. Palmer A., Mason T.G., Xu J.Y., Kuo S.C, and Wirtz D. Diffusing wave spectroscopy microrheology of actin filament networks. *Biophys. J.*, 1999, vol. 76, n° 2, 1063-1071.

117. Parekh A., and Velegol D. Collagen gel anisotropy measured by 2-d laser trap microrheometry. *Ann. Biomed. Eng.*, 2007, vol. 35, n° 7, 1231-1246.
118. Parrin A.P., Netherton S.E., Bross L.S., McFadden C.S., and Blackstone N.W. Circulation of fluids in the gastrovascular system of Stoloniferan Octocoral. *Biol. Bull.*, 2010, vol. 219, 112-121.
119. Parry D.A.D., and Craig A.S. Quantitative electron microscope observations of collagen fibrils in rat-tail tendon. *Biopolymers*, 1977, vol. 16, n° 5.
120. Percival E. On the strobilization of Aurelia. *Q. J. Microsc. Sci.*, 1923, vol. 67, n° 265, 85-100.
121. Peyri  ras N., and Bourguine P. Cell tracking of development using 2-photon scanning and light sheet imaging. *Int. J. Dev. Neurosci.*, 2010, vol. 28, n° 8, 653.
122. Plankton net.  
[http://planktonnet.awi.de/index.php?contenttype=image\\_details&itemid=16926#content](http://planktonnet.awi.de/index.php?contenttype=image_details&itemid=16926#content). 2012.
123. Pottier N. Physique statistique hors équilibre:   quation de Boltzmann, réponse linéaire. Notes de cours de DEA de Physique du solide, 1997.
124. Pouille P.A., Ahmadi P., Brunet A.C., and Farge E. Mechanical Signals Trigger Myosin II Redistribution and Mesoderm Invagination in Drosophila Embryos. *Science Signaling*, 2009, vol. 2, n° 66, ra16.
125. Rasband W.S. 2007. ImageJ. Bethesda, MD: US National Institutes of Health. Voir <http://rbs.info.nih.gov/ij/>. Code source du plugin disponible sur <http://www.msc.univ-paris-diderot.fr/~olivier/ImageJ/>; tracker\_Install.zip; 29/03/2009.
126. Raub C.B., Suresh V., Krasieva T., Lyubovitsky J., Mih J.D., Putnam A.J., Tromberg B.J., and George S.C. Noninvasive assessment of collagen gel microstructure and mechanics using multiphoton microscopy. *Biophys. J.*, 2007, vol. 92, n° 6, 2212-2222.
127. Rauzi M., Verant P., Lecuit T., and Lenne P.F. Nature and anisotropy of cortical forces orienting Drosophila tissue morphogenesis. *Nature Cell Biology*, 2012, vol. 10, n° 12, 1401-1410.
128. Reber-M  ller S., Spissinger T., Schuchert P., Spring J., and Schmid V. An extracellular matrix protein of jellyfish homologous to mammalian fibrillins forms different fibrils depending on the life stage of the animal. *Dev. Biol.*, 1995, vol. 169, n° 2, 662-672.
129. Reber-M  ller S., Streitwolf-Engel R., Yanze N., Schmid V., Stierwald M., Erb M., and Seipel K. BMP2/4 and BMP5-8 in jellyfish development and transdifferentiation. *Int. J. Dev. Biol.*, 2006, vol. 50, n° 4, 377-384.
130. Reynolds E.S. Use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.*, 1963, vol. 17, n° 1, 208-212.
131. Rodd A.B., Cooper-White J., Dunstan D.E., and Boger D.V. Gel point studies for chemically modified biopolymer networks using small amplitude oscillatory rheometry. *Polymer*, 2001, vol. 42, n° 1, 185-198.
132. Romanes G.J. Further observations on the locomotor system of medusae. *Proceedings of the Royal Society of London*, 1877, vol. 25, 464-487.

133. Russel F.S. The medusae of the british isles. Vol. II. Pelagic Scyphozoa, with a supplement to Vol. I. Cambridge: at the University Press, 1970, 292 p.
134. Saez A., Anon E., Ghibaudo M., Du Roure O., Di Meglio J.M., Hersen P., Silberzan P., Buguin A., and Ladoux B. Traction forces exerted by epithelial cell sheets. *Journal of Physics - Condensed Matter*, 2010, vol. 22, n° 19, 194119.
135. Saez A., Ghibaudo M., Buguin A., Silberzan P., and Ladoux B. Rigidity-driven growth and migration of epithelial cells on microstructured anisotropic substrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2007, vol. 104, n° 20, 8281-8286.
136. Sarras M.P., Zhang X.M., Huff J.K., Accavitti M.A., Stjohn P.L., and Abrahamson D.R. Extracellular matrix (mesoglea) of *Hydra vulgaris* .3. Formation and function during morphogenesis of hydra cell aggregates. *Dev. Biol.*, 1993, vol. 157, n° 2, 383-398.
137. Satterlie R.A., Thomas K.S., and Gray G.C. Muscle organization of the cubozoan jellyfish *Tripedalia cystophora* Conant 1897. *Biol. Bull.*, 2005, vol. 209, n° 2, 154-163.
138. Savin T., Kurpios N.A., Shyer A.E., Florescu P., Liang H.Y., Mahadevan L., and Tabin C.J. On the growth and form of the gut. *Nature*, 2011, vol. 476, n° 7358, 57-62.
139. Schmid V., Bally A., Beck K., Haller M., Schlage W.K., and Weber C. The extracellular matrix (mesoglea) of hydrozoan jellyfish and its ability to support cell-adhesion and spreading. *Hydrobiologia*, 1991, vol. 216, 3-10.
140. Seipel K., Eberhardt M., Müller P., Pescia E., Yanze N., and Schmid V. Homologs of Vascular Endothelial Growth Factor and Receptor, VEGF and VEGFR, in the jellyfish *Podocoryne carnea*. *Dev. Dyn.*, 2004, vol. 231, n° 2, 303-312.
141. Seipel K., and Schmid V. Mesodermal anatomies in cnidarian polyps and medusae. *Int. J. Dev. Biol.*, 2006, vol. 50, n° 7, 589-599.
142. Seipel K., and Schmid V. Evolution of striated muscle: Jellyfish and the origin of triploblasty. *Dev. Biol.*, 2005, vol. 282, n° 1, 14-26.
143. Shaposhnikova T., Matveev I., Napara T., and Podgornaya O. Mesogleal cells of the jellyfish *Aurelia aurita* are involved in the formation of mesogleal fibres. *Cell Biol. Int.*, 2005, vol. 29, n° 11, 952-958.
144. Shimizu H., Aufschnaiter R., Li L., Sarras M.P., Borza D.B., Abrahamson D.R., Sado Y., and Zhang X.M. The extracellular matrix of hydra is a porous sheet and contains type IV collagen. *Zoology*, 2008, vol. 111, n° 5, 410-418.
145. Shimizu H., Zhang X.M., Zhang J.S., Leontovich A., Fei K.Y., Yan L., and Sarras M.P. Epithelial morphogenesis in hydra requires de novo expression of extracellular matrix components and matrix metalloproteinases. *Development*, 2002, vol. 129, n° 6, 1521-1532.
146. Southward A.J. Observations of the ciliary currents of the jellyfish *Aurelia aurita* L. *J. Mar. biol. Ass. U. K.*, 1955, vol. 34, n° 2, 201-216.
147. Thompson D.A.W. On growth and form. Cambridge: at the University Press, 1917, 816 p.
148. Tseng Y., Kole T.P., and Wirtz D. Micromechanical mapping of live cells by multiple-particle-tracking microrheology. *Biophys. J.*, 2002, vol. 83, n° 6, 3162-3176.

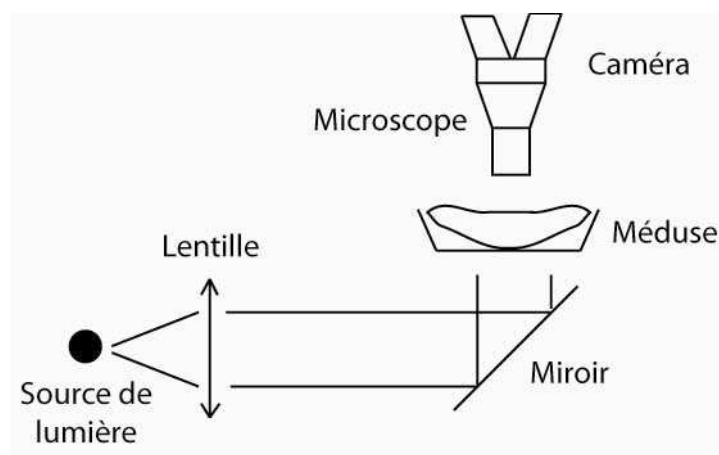
149. Tucker R.P., Shibata B., and Blankenship T.N. Ultrastructure of the mesoglea of the sea anemone *Nematostella vectensis* (Edwardsiidae). *Invertebrate Biology*, 2011, vol. 130, n° 1, 11-24.
150. Turing A.M. The chemical basis of morphogenesis. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 1952, vol. 237, n° 641, 37-72.
151. Unbekandt M., del Moral P.M., Sala F.G., Bellusci S., Warburton D., and Fleury V. Tracheal occlusion increases the rate of epithelial branching of embryonic mouse lung via the FGF10-FGFR2b-Sprouty2 pathway. *Mech. Dev.*, 2008, vol. 125, n° 3-4, 314-324.
152. Underwater Photography. <http://www.anderssalesjo.com/?id=1193&lang=42>. 2012.
153. Vader D., Kabla A., Weitz D., and Mahadevan L. Strain-induced alignment in collagen gels. *PLoS ONE*, 2009, vol. 4, n° 6, e5902.
154. Valentine M.T., Kaplan P.D., Thota D., Crocker J.C., Gisler T., Prud'homme R.K., Beck M., and Weitz D.A. Investigating the microenvironments of inhomogeneous soft materials with multiple particle tracking. *Physical Review E*, 2001, vol. 64, n° 6.
155. Velegol D., and Lanni F. Cell traction forces on soft biomaterials. I. Microrheology of type I collagen gels. *Biophys. J.*, 2001, vol. 81, n° 3, 1786-1792.
156. Verdier C., Etienne J., Duperray A., and Preziosi L. Rheological properties of biological materials. *Comptes Rendus Physique*, 2009, vol. 10, n° 8, 790-811.
157. Wang X.M, Harris R.E., Bayston L.J., and Ashe H.L. Type IV collagens regulate regulate BMP signalling in *Drosophila*. *Nature*, 2008, vol. 455, n° 7209, 72-77.
158. Warlus S., and Ponton A. A new interpretation for the dynamic behavior of complex fluids at the sol-gel transition using the fractional calculus. *Rheologica Acta*, 2009, vol. 48, n° 1, 51-58.
159. Weber C., Kurz E., and Schmid V. The fibrous system of the extracellular matrix of *Podocoryne carnea* and its degradation by the subumbrellar plate endoderm demonstrated by a monoclonal-antibody. *Tissue & Cell*, 1987, vol. 19, n° 6, 757-771.
160. Weber C., and Schmid V. The fibrous system in the extracellular matrix of hydromedusae. *Tissue & Cell*, 1985, vol. 17, n° 6, 811-822.
161. Weihs D., Mason T.G., and Teitell M.A. Bio-microrheology: a frontier in microrheology. *Biophys. J.*, 2006, vol. 91, n° 11, 4296-4305.
162. Whipff P.J., and Hinz B. Integrins and the activation of latent transforming growth factor beta 1 - an intimate relationship. *Eur. J. Cell Biol.*, 2008, vol. 87, n° 8-9, 601-615.
163. Yuan D., Nakanishi N., Jacobs D.K., and Hartenstein V. Embryonic development and metamorphosis of the scyphozoan *Aurelia*. *Dev. Genes Evol.*, 2008, vol. 218, n° 10, 525-539.
164. Zanella C., Campana M., Rizzi B., Melani C., Sanguinetti G., Bourguine P., Mikula K., Peyri  ras N., and Sarti A. Cells segmentation from 3-D confocal images of early zebrafish embryogenesis. *IEEE Transactions on Image Processing*, 2010, vol. 19, n° 3, 770-781.

# Annexes

## A. Techniques de visualisation

### ‘Shadowgraph imaging’

Le réseau de canaux de la méduse *Aurelia aurita* peut être visualisé par la technique de ‘shadowgraph imaging’, qui permet d’augmenter les contrastes, et de visualiser les irrégularités d’un matériau transparent, comme l’est la méduse. La méduse est placée retournée (bras oraux vers le haut), afin d’observer la sous-ombrelle, où sont visibles les canaux. La méduse est éclairée par une lumière parallèle, obtenue en plaçant la source lumineuse dans le plan focal d’une lentille convergente. Une caméra permet la visualisation. Le montage est représenté sur la figure suivante (figure A.1).



**Figure A.1** – Schéma du montage de ‘shadowgraph’.

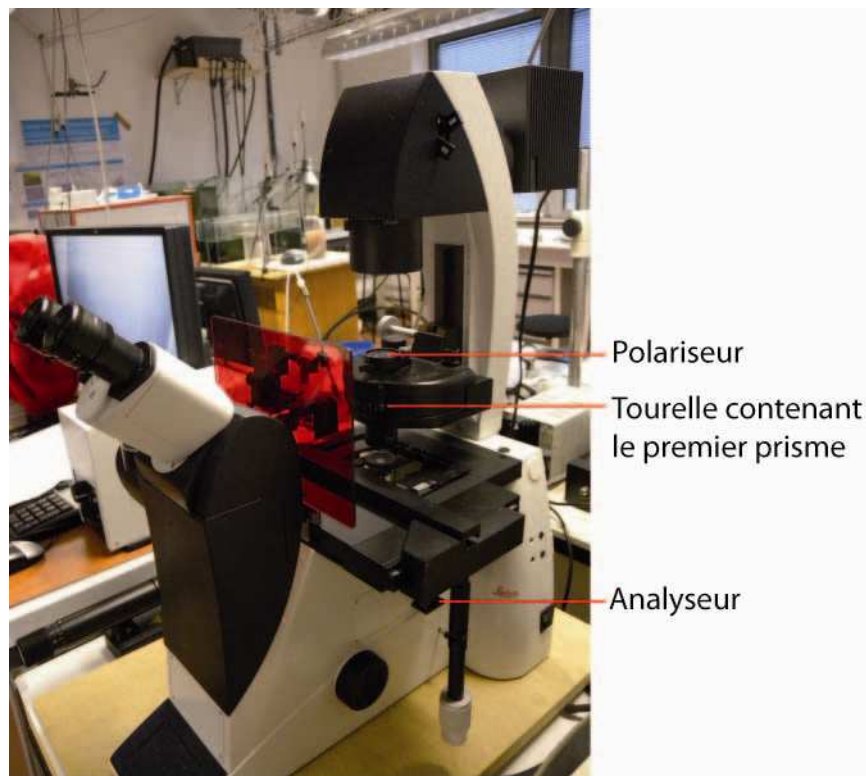
Un filtre de couleur peut être placé sur le trajet lumineux, afin d’obtenir une image plus contrastée.

## Microscopie à contraste interférentiel différentiel

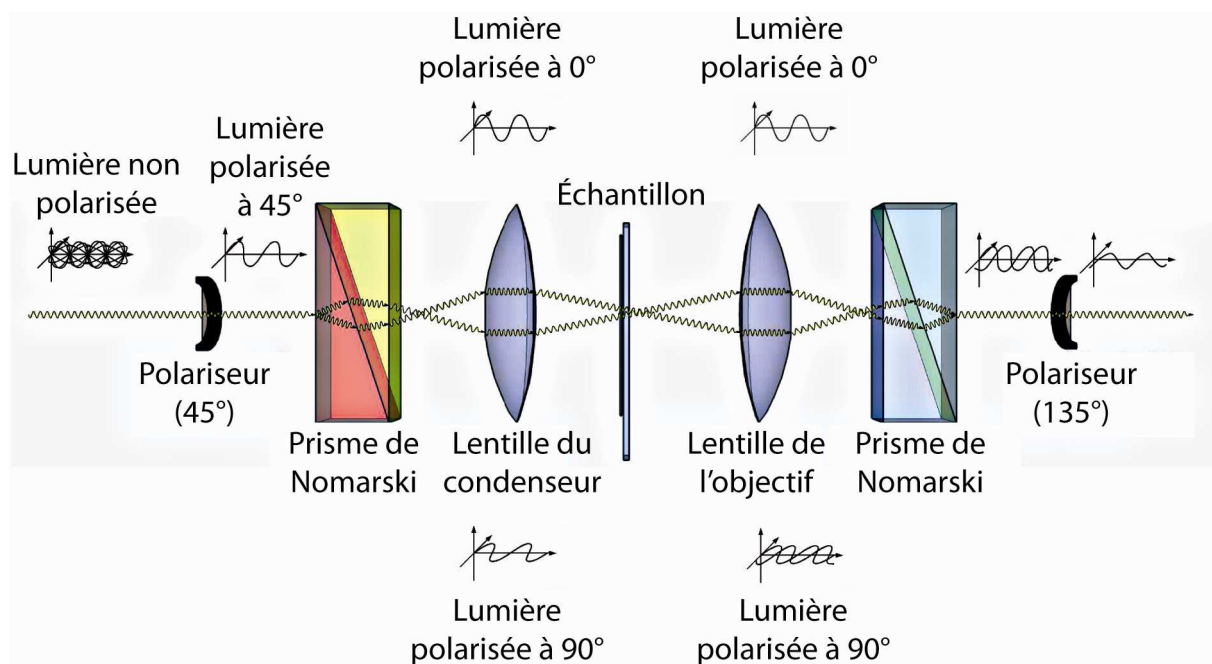
La microscopie à contraste interférentiel différentiel est une technique optique qui permet d'augmenter le contraste d'échantillons transparents. Cette technique est basée sur l'interférométrie, qui permet de voir les légères variations de chemin optique à travers un échantillon, et ainsi de visualiser des détails qui passeraient sinon inaperçus.

La figure A.2 est une photo du microscope à contraste interférentiel différentiel utilisé. La figure A.3 présente schématiquement le principe de la microscopie à contraste interférentiel différentiel.

La lumière est tout d'abord polarisée par un polariseur à  $45^\circ$ , puis séparée grâce à un prisme dit de Nomarski en deux faisceaux polarisés orthogonalement et cohérents entre eux. Ces faisceaux sont ensuite focalisés sur l'échantillon grâce à la lentille du condenseur, puis le traversent, en passant par des points adjacents, séparés d'une distance de l'ordre de la résolution du microscope, de l'ordre de  $0.2\ \mu\text{m}$ . Ils vont traverser des zones de l'échantillon dont l'indice optique et/ou l'épaisseur peuvent être différents, et vont alors avoir des chemins optiques différents, et présenteront une différence de phase entre eux. De nombreuses paires de rayons lumineux, polarisés à  $0^\circ$  et  $90^\circ$ , traversent des paires de points adjacents de l'échantillon. Ainsi, les faisceaux lumineux polarisés à  $0^\circ$  et  $90^\circ$  donnent des images de l'échantillon identiques, mais légèrement décalées l'une par rapport à l'autre. Ces deux faisceaux, étant polarisés orthogonalement, ne peuvent pas encore interférer. Ils sont ensuite focalisés sur le second prisme de Nomarski, qui aligne la polarisation des deux faisceaux à  $135^\circ$ , afin qu'ils puissent interférer. La différence de phase, provenant de la différence de chemin optique entre deux points adjacents, est convertie en variation d'intensité lumineuse. Enfin, un second prisme, l'analyseur, élimine la lumière qui a été directement transmise, sans passer par les prismes. L'image finale semble en relief, et fait apparaître des détails non visibles par visualisation directe (sans les prismes de Nomarski). Les différences de phase rencontrées sont souvent faibles, inférieures à  $90^\circ$ . Ceci est dû à la continuité de l'épaisseur et de l'indice de réfraction de la plupart des échantillons. Ainsi, une cellule dans l'eau présente des différences d'indice optique qui n'excèdent pas 0.05. Il est important de noter qu'une faible différence de phase est nécessaire au bon fonctionnement de la microscopie à contraste interférentiel différentiel. En effet, si à un endroit la différence de phase atteint  $180^\circ$  (respectivement  $360^\circ$ ), l'interférence sera totalement destructive (respectivement constructive), et l'image présentera une région anormalement sombre (respectivement brillante). C'est pourquoi la microscopie à contraste interférentiel différentiel est adaptée à des échantillons transparents et relativement homogènes, présentant de faibles variations d'indice. Elle est particulièrement adaptée à la visualisation de cellules *in vitro*, et n'est normalement pas recommandée pour l'observation de tissus épais, présentant d'importantes variations de propriétés optiques. Cependant, la méduse présentant de minces couches cellulaires et une épaisse couche de mésogée, transparente et assez homogène, la microscopie à contraste interférentiel différentiel s'est avérée très adaptée à la visualisation de cet animal, *in vivo*.



**Figure A.2** – Photo du microscope à contraste interférentiel différentiel.



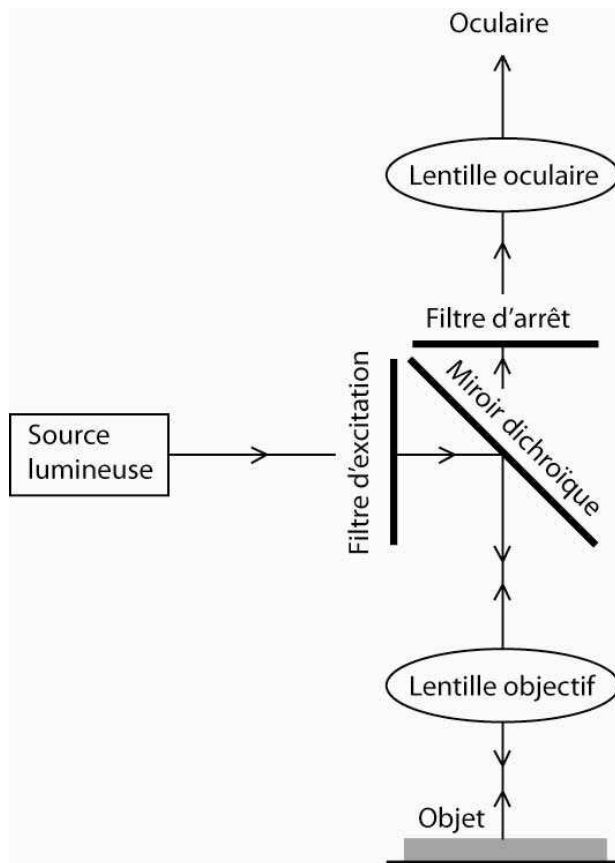
**Figure A.3** – Principe de la microscopie à contraste interférentiel différentiel.



## Microscopie à fluorescence

La microscopie à fluorescence permet l'observation d'échantillons fluorescents.

Une molécule est dite fluorescente si elle peut être excitée par des photons d'une certaine longueur d'onde, puis se désexcite quelques nanosecondes plus tard en réémettant des photons d'une autre longueur d'onde. Les photons émis ont une énergie inférieure aux photons absorbés, donc ont une longueur d'onde plus grande. Un microscope à fluorescence est un microscope permettant d'exciter les molécules fluorescentes d'un échantillon dans une certaine gamme de longueurs d'ondes, grâce à des filtres, et de récupérer la lumière émise, *via* de nouveaux filtres, afin de former l'image.



**Figure A.4** – Schéma des éléments principaux de la microscopie à fluorescence.

Des techniques variées permettent de rendre certaines parties d'un échantillon biologique fluorescentes. La transgénèse permet par exemple d'introduire dans le génome d'un organisme vivant un gène permettant d'exprimer une protéine fluorescente (souvent la GFP, Green Fluorescent Protein, provenant de la méduse *Aequorea victoria*) et d'associer ce gène à un gène propre de l'organisme. Ainsi, certaines cellules et certaines structures cellulaires

deviennent fluorescentes. Une autre méthode, plus simple techniquement, est de marquer certaines structures cellulaires par des molécules fluorescentes. Ces molécules peuvent par exemple s'insérer dans l'ADN, ou dans la membrane des cellules, ou encore se lier aux filaments d'actine ou aux microtubules.

La figure A.4 schématise le principe d'un microscope à fluorescence. Ce dernier est équipé de certains éléments spécifiques, dont les principaux sont les suivants : une source lumineuse puissante, souvent une lampe à vapeur de mercure ; un filtre d'excitation qui filtre la lumière émise par la source lumineuse pour ne laisser passer que les longueurs d'ondes voisines de la longueur d'onde d'absorption de la molécule à exciter ; un filtre d'arrêt qui laisse passer la lumière émise par fluorescence mais bloque la lumière d'excitation ; un miroir dichroïque, qui ne réfléchit que la lumière d'excitation et laisse passer la lumière réémise par fluorescence.

## Microscopie électronique à balayage

La microscopie électronique à balayage (MEB) permet d'obtenir des images de haute résolution de la surface d'un échantillon. Le principe est d'envoyer un faisceau d'électrons sur la surface de l'échantillon, qui en réponse réémet des électrons secondaires. Ils sont ensuite analysés par les différents détecteurs, qui permettent de reconstruire une image en trois dimensions de la surface. L'avantage de l'utilisation d'électrons par rapport aux photons du microscope optique est d'augmenter la résolution, qui est améliorée quand la longueur d'onde des particules qui éclairent les cibles diminue. Des photons dans le visible ont une longueur d'onde de l'ordre de 500 nm, tandis que des électrons accélérés à 100 kV ont une longueur d'onde de l'ordre de 1 pm. La résolution d'un microscope optique est de l'ordre de 200 nm, tandis que celle d'un microscope électronique est de l'ordre de 1 nm.

Un canon à électrons produit un faisceau d'électrons, qui est focalisé sur l'échantillon à analyser, grâce à des lentilles électroniques, qui jouent le même rôle vis-à-vis du faisceau d'électrons que des lentilles conventionnelles. Les électrons interagissent avec l'échantillon, qui génère alors des électrons secondaires. Ces derniers sont accélérés vers un détecteur, qui amplifie le signal. À chaque point d'impact correspond un signal électrique, dont l'intensité dépend à la fois de la nature de l'échantillon et de sa topographie en chaque point. Il est alors possible d'obtenir une cartographie de la zone balayée. Le canon à électrons et les détecteurs étant immobiles, l'échantillon, fixé sur un porte-objet, peut être déplacé dans les trois directions de l'espace. Par ailleurs, un système de pompes à vide permet d'obtenir un vide à une pression de l'ordre de  $10^{-3}$  Pa à  $10^{-4}$  Pa, afin que les électrons n'interagissent pas avec les molécules d'air.

Avant de pouvoir être observé au MEB, un échantillon biologique doit être préparé : il doit être déshydraté, séché et métallisé. Un échantillon observé au MEB ne doit en effet comporter aucune trace d'eau, car en raison du vide présent dans la chambre d'observation du MEB, les molécules d'eau de l'échantillon risqueraient de détruire les tissus en s'évaporant, ainsi que de polluer la chambre d'observation. Un échantillon biologique contient de l'eau, et est souvent assez mou et fragile. Il nécessite une préparation délicate, afin de le déshydrater sans détruire la paroi des cellules et l'organisation des tissus. Il est tout d'abord fixé : le but de la fixation est de tuer les cellules, tout en conservant les structures tissulaires, afin que l'on puisse observer les échantillons dans un état aussi proche que possible de l'état vivant. Si besoin est, il est découpé, car il ne doit pas être de taille supérieure à 1 cm, pour pouvoir être monté sur le porte objet. Il est ensuite séché, par contournement du point critique. Si besoin, il peut ensuite être manipulé : découpé, disséqué... La dernière étape est la métallisation, qui a pour but de rendre l'échantillon conducteur, évitant ainsi l'accumulation des charges parasites négatives sur sa surface au cours de l'observation. La métallisation consiste à déposer à sa surface une fine couche métallique (d'or, de carbone, ou de platine). Une fois nettoyé, séché, rendu conducteur, l'échantillon est prêt à être monté sur le porte-objet et à être placé dans la chambre d'observation.

## **B. Article**

Micro- and Macrorheology of Jellyfish Extracellular Matrix

*Biophysical Journal*, 2012

&

Supporting Material

# Micro- and Macrorheology of Jellyfish Extracellular Matrix

Camille Gambini, Bérengère Abou, Alain Ponton, and Annemiek J. M. Cornelissen\*

Laboratoire Matière et Systèmes Complexes, UMR 7057, Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

**ABSTRACT** Mechanical properties of the extracellular matrix (ECM) play a key role in tissue organization and morphogenesis. Rheological properties of jellyfish ECM (mesoglea) were measured *in vivo* at the cellular scale by passive microrheology techniques: microbeads were injected in jellyfish ECM and their Brownian motion was recorded to determine the mechanical properties of the surrounding medium. Microrheology results were compared with macrorheological measurements performed with a shear rheometer on slices of jellyfish mesoglea. We found that the ECM behaved as a viscoelastic gel at the macroscopic scale and as a much softer and heterogeneous viscoelastic structure at the microscopic scale. The fibrous architecture of the mesoglea, as observed by differential interference contrast and scanning electron microscopy, was in accord with these scale-dependent mechanical properties. Furthermore, the evolution of the mechanical properties of the ECM during aging was investigated by measuring microrheological properties at different jellyfish sizes. We measured that the ECM in adult jellyfish was locally stiffer than in juvenile ones. We argue that this stiffening is a consequence of local aggregations of fibers occurring gradually during aging of the jellyfish mesoglea and is enhanced by repetitive muscular contractions of the jellyfish.

## INTRODUCTION

The extracellular matrix (ECM) provides structural scaffolding for cellular organization and strongly influences the functional behaviors of resident cells by biochemical and mechanical interactions. Thus, the mechanical and viscoelastic properties of the ECM play a crucial role in cell behaviors, tissue organization, morphogenesis, and development (1–5).

In our search to understand the morphogenesis of the endodermal gastrovascular system of jellyfish, the architecture and the mechanical properties of the ECM (mesoglea) surrounding this tissue are of special interest.

Jellyfish are particularly well suited to the study of *in vivo* mechanical properties of the ECM. Indeed, the ECM is the most prominent structure in jellyfish, with some jellyfish being transparent such as the widespread common jellyfish *Aurelia aurita* (Scyphozoa, Cnidaria). Such transparency enables us to easily study its ECM by microscopy techniques.

In jellyfish, the mesoglea is an extracellular substance situated between the epidermal and endodermal layers. It is a highly hydrated fibrous substance containing mucopolysaccharides (6), collagen fibrils (6–10), microfibrils rich in protein homologous to mammalian fibrillins (11), and other structural proteins. Its stiffness is provided by collagen fibrils and its elasticity by fibrillin microfibrils (12). Mesoglea of some jellyfish species, as *A. aurita*, contain mesogleal cells, which are free motile cells involved in the formation of mesogleal fibers (13).

The ECM of jellyfish performs important functions. As in vertebrates, its elementary function is to serve as a base for cell attachment to maintain the animal body structure (6).

It is also involved in the transport and storage of nutrients (6) and in buoyancy regulation (14). The fiber architecture of the mesoglea is constructed in close functional relation to the locomotory system of the jellyfish (15). Moreover, recent studies proved that jellyfish locomotion and morphogenesis are tightly linked (16,17). Because jellyfish has no antagonist muscle, recovery after muscle contraction is affected by the ECM: its elasticity allows passive release of the energy stored during the contracted state (8,12,18). Finally, the mesoglea plays an important role in control of cellular migration and differentiation and morphogenetic processes (19–24).

Many studies have been conducted on the chemical composition, architecture, and role of the mesogleal ECM, but there are few measurements of its mechanical properties and these measurements were always performed at the macroscopic scale: Alexander (25) studied the creep response of mesoglea, and Megill et al. (12) its compressive stiffness. However, to study the role of the mechanical properties of ECM in cellular migration and morphogenesis, mechanical measurements have to be performed locally, at the cellular scale. In recent years, microrheology techniques have shown to be powerful ways to probe the viscoelastic properties of soft and biological materials at the micron scale (26,27). These methods enable us to study mechanical properties of small biological samples (28), including living cells (29–32), and allow measurements of heterogeneities through the sample (33,34). Microrheology techniques involve the use of microprobes to measure the relation between stress (probe force) and deformation (probe position) at the microscopic scale. Various techniques can be used to apply the force, like manipulation of magnetic beads (35) or laser-trap microrheometry techniques (36). Instead of using an external excitation to move the probes, the intrinsic Brownian motion of the particles can be used (37). In this

Submitted July 21, 2011, and accepted for publication November 28, 2011.

\*Correspondence: annemiek.cornelissen@univ-paris-diderot.fr

Editor: Charles Wolgemuth.

© 2012 by the Biophysical Society  
0006-3495/12/01/0001/9 \$2.00

doi: 10.1016/j.bpj.2011.11.4004

case, the driving force is thermal. The probe position can be measured by video microscopy (28) or dynamic light scattering techniques (37,38).

In this article, we measure the mechanical properties of the ECM by injecting microbeads and subsequently tracking their Brownian motion by video microscopy techniques. The driving force is thermal, with an energy scale corresponding to  $k_B T$ , with  $k_B$  being the Boltzmann constant and  $T$  the absolute temperature. Because this driving force is small, only the linear viscoelastic response of the sample is probed. Measurements of the particles' mean-squared displacement (MSD) through particle tracking give access to the local elastic ( $G'$ ) and viscous ( $G''$ ) moduli of the embedding medium (39). In addition, rheological measurements are performed at a macroscopic scale with a shear rheometer. The fibrous architecture of the mesoglea observed by differential interference contrast (DIC) and scanning electron microscopy (SEM) is in accordance with our measurements of the mechanical properties of the ECM at macroscopic and microscopic scales. Furthermore, we investigate the evolution of the mechanical properties of the ECM during aging in performing microrheological measurements at different stages of jellyfish development.

## MATERIAL AND METHODS

### Jellyfish culture

Jellyfish *A. aurita* were reared in the laboratory, at room temperature, in artificial seawater, produced by diluting 40 g of synthetic sea salt (Instant Ocean; Spectrum Brands, Madison, WI) per liter of osmosis water (osmolarity 1100 mOsm). Strobilation in polyps was induced by a lowering of temperature down to 10°C (40). The newborn ephyrae were bred to adult stage.

The measurements were performed on jellyfish at different developmental stages: juvenile or adult jellyfish. Juvenile jellyfish had just reached the circular shape of adult medusas with a diameter of ~1 cm. Adult jellyfish were at a much later developmental stage (several months) with a diameter of ~10 cm.

### Visualization of the thick fibers in the mesoglea

Slices of mesoglea were cut from adult jellyfish and the organization of their fibers was revealed using DIC microscopy (inverted microscope DMI 3000 B; Leica, Nanterre, France, with objective PL Fluotar 20×/0.40 Corr; also Leica). Images were recorded with a camera (CFW-1612M; Scion, Frederick, MD) controlled by ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD). The slices of mesoglea were either cut lateral along the oral-aboral axis, ~1–2 mm above the endoderm, to visualize the thick vertical fibers, or perpendicularly to the oral-aboral axis, ~10  $\mu$ m under the exumbrella, to see the plexus of thick tangential fibers (Fig. 1).

### Scanning electron microscopy experiments

For SEM experiments, juvenile jellyfish and pieces of mesoglea cut from adult jellyfish were fixed overnight in 5% glutaraldehyde (Cat. No. 49626; Sigma, Saint-Quentin-Fallavier, France) in 0.1 M cacodylate buffer (Cat. No. C4945; Sigma) (41). They were rinsed in 0.5 M cacodylate buffer,

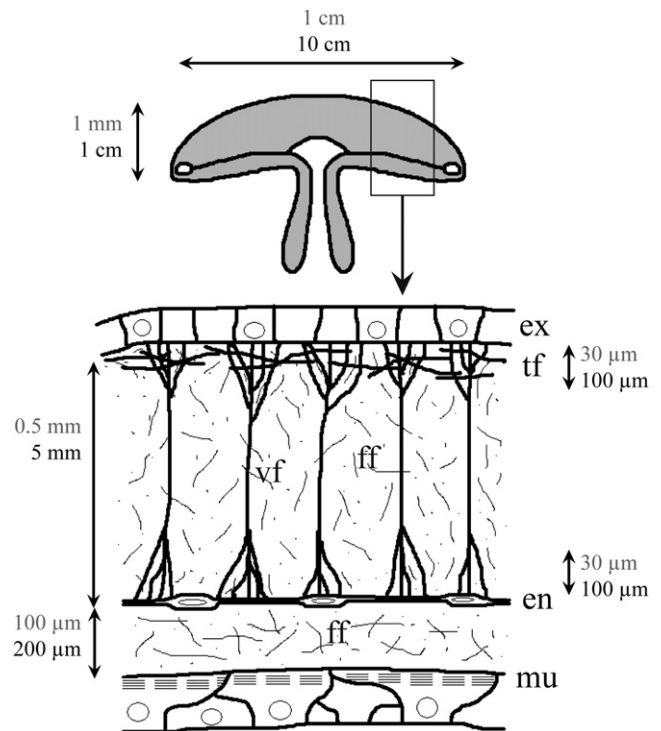


FIGURE 1 Schematic view of the fibrous network organization of mesoglea of *A. aurita*. For clarity, the diagram does not show actual sizes of the various structures. (Vertical arrows) Direction of the oral-aboral axis. Characteristic length-scales of jellyfish and mesogleal fibrous architecture network for adult jellyfish (solid) and juvenile jellyfish (shaded). Visualizations by DIC microscopy of the thick vertical and tangential fibers are shown in Fig. 2, A and B, respectively. Visualizations by SEM microscopy of the fine fibers are shown in Fig. 3. Endoderm (en); exumbrella (ex); fine fibers (ff); subumbrellar swimming muscle (mu); thick tangential fibers (tf); thick vertical fibers (vf). Figure adapted from Weber and Schmid (15).

dehydrated with acetone, and critical-point-dried with CO<sub>2</sub>. To best preserve the biological structures, the osmolarity of the fixative and rinsing solutions were verified to be close to the seawater osmolarity (42). To visualize the internal structure of the mesoglea, the skin of the critical-point-dried specimen was carefully lifted at different places with a fine needle to observe the fibrous network ~100–400  $\mu$ m above the endoderm. The specimens were then coated with platinum. The observations were performed with a field emission scanning electron microscope (SUPRA 40; Carl Zeiss, Nanterre, France).

### Macrorheology experiments

For the macrorheology experiments, cylindrical slices of mesoglea (diameter 25 mm and height 2 mm, perpendicular to the oral-aboral axis) were cut from adult jellyfish, far from cellular sheets and tangential big fibers. The measurements were performed with a controlled-strain rheometer (ARES G2; TA instruments, Guyancourt, France), at 20°C, with parallel-plate geometry (diameter 25 mm; gap 2 mm). To avoid any sliding of the sample, rough plates were used and a constant normal force was applied during the measurement. Sample evaporation was minimized using a solvent trap.

The elastic ( $G'$ ) and viscous ( $G''$ ) moduli were measured by imposing sinusoidal strains and measuring resulting stresses. The linearity of the sample was checked by measuring  $G'$  and  $G''$  with sinusoidal strains at fixed frequency ( $f = 1$  Hz) and increasing strain amplitudes from 0.01 to 100%.

The samples of mesoglea were linear up to 1% strain amplitude. The frequency dependence of the moduli  $G'$  and  $G''$  was measured in the linear viscoelastic range by varying the frequency between 0.13 and 20 rad/s at a constant strain amplitude set to 0.3%.

## Microrheology experiments on juvenile jellyfish

Suspensions of yellow green amine-modified fluorescent microspheres with a diameter of 1  $\mu\text{m}$  (F8765; Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) were prepared at a concentration of  $10^8$  particles/ml of artificial seawater.

Details of the injection and microrheology experimental procedure are described in the [Supporting Material](#).

In short, a few nanoliters of microbead suspension were injected ~200  $\mu\text{m}$  above the subumbrella so that the microbeads were well embedded in the mesoglea far from cellular sheets, but could be visualized in vivo to track their Brownian motion.

After injection, jellyfish were replaced in artificial seawater, where they swam freely during one day before any measurement of the motion of the beads. It was verified that diffusion of the injected seawater and local embedding of each bead in the mesogleal fibrous network were well achieved one day after injection. We also verified that the microinjection process did not affect normal morphology and behavior of the jellyfish.

For the microrheological measurements, the jellyfish were put on a glass coverslip, in the same position as for the injection: the umbrella was lying flat and the subumbrella was in contact with the coverslip (see [Fig. S1](#)). The thermal motion of the microbeads in the ECM was recorded at room temperature ( $T = 21 \pm 2^\circ\text{C}$ ), with bright light, using the  $\times 63$  glycerine immersion objective, coupled to a CMOS camera (Fastcam-Ultima 1024; Photron, Marly-le-Roi, France). Beads phagocytized by mesogleal cells are ignored. Images were acquired at 500 frames/s during 8 s, with a  $100 \times 100 \mu\text{m}^2$  field of view. Depending on the realization, 5–30 microbeads could be recorded in the same field of view. A home-made analysis software (43) allowed us to track the bead positions  $x(t)$  and  $y(t)$ . To increase signal/noise ratio, we only tracked microbeads moving in the focus plane of the objective.

After drift-correction of the beads positions, the time-averaged two-dimensional MSD  $\langle \Delta r^2(t) \rangle_t = \langle [x(t') + t - x(t')]^2 + [y(t') + t - y(t')]^2 \rangle_t$  was calculated for each bead, improving the statistical accuracy. To maintain reliable statistics, the data from the MSD were kept in the range  $t < 2$  s.

## Microrheology experiments on adult jellyfish

Microrheology experiments were also performed on adult jellyfish. As they are much bigger (10 cm in diameter) than juvenile ones, slices of their mesoglea were hand-cut, far from cellular sheets and tangential large fibers (~1–2 mm above the endoderm). The experiments were performed on these slices similarly as in vivo measurements described above.

No muscle fibers were present on these slices and therefore it was not necessary to anesthetize the samples in  $\text{MgCl}_2$ . After injection of the fluorescent microbeads, the samples were stored one day in a fridge at  $7^\circ\text{C}$ , to preserve them from bacteria and to allow equilibration between bead suspension and ECM. We verified that the microinjection and the storage at low temperature did not affect the shape of the sample and the behavior of the mesogleal cells; at low temperature, the samples were well preserved for several weeks, as also reported in Weber et al. (44). As for the juvenile jellyfish, the thermal motion of the microbeads was recorded at room temperature, the drift corrected, and the MSD calculated for each bead.

## Control experiments

Microrheology experiments in calibrated glycerol solutions were performed under similar conditions to verify whether the experimental setup and statistics applied are reliable. To rule out a systematic bias in bead distributions, microrheological experiments were repeated in juvenile jellyfish under the same experimental conditions as for adult jellyfish. To

exclude that the differences observed between juvenile and adult jellyfish are due to the chemical interactions of the bead surface groups with its environment, microrheology control experiments were also performed with polystyrene microbeads.

These control experiments are presented in the [Supporting Material](#).

## Viscoelastic moduli from particle tracking

To compare microrheological with macrorheological measurements, the frequency-dependent elastic modulus  $G'(\omega)$  and viscous modulus  $G''(\omega)$  were computed from the measured MSD. The frequency dependence of the viscoelastic moduli is obtained from the two-dimensional MSD by using the generalized Stokes-Einstein relation (37,39,45),

$$G(s) = \frac{k_B T}{\pi R s \frac{3}{2} \langle \Delta r^2(s) \rangle}, \quad (1)$$

where  $k_B$  is the Boltzmann constant,  $T$  the temperature,  $R$  the microbead radius,  $s$  the Laplace frequency,  $\langle \Delta r^2(s) \rangle$  the Laplace transform of the MSD, and  $G(s)$  the complex viscoelastic modulus in the Laplace domain. In [Eq. 1](#), the factor  $3/2$  is a dimensional correction: the three-dimensional MSD is simply calculated from the two-dimensional MSD by multiplying the latter by  $3/2$ , assuming that the medium surrounding locally each bead is isotropic (27). The generalized Stokes-Einstein relation ([Eq. 1](#)) can be obtained from a generalized Langevin model equation, assuming moreover that the Stokes relation can be generalized to viscoelastic fluids with a frequency-dependent linear viscoelastic modulus and that inertial effects are negligible (27,39).

The viscoelastic moduli can be obtained from the dynamics of the probe particles assuming that the MSD of the beads can be described by a local power law (39). This method, valid for MSD curves changing slowly, eschews any Laplace transformation of MSD ([Eq. 1](#)); resulting truncation errors introduced by numerical transformation of data over a limited range; and the use of any arbitrary functional form to fit  $G(s)$  (39,46). The power law behavior is determined from the logarithmic time derivative of the MSD. For thermally driven microbeads, the slope of the logarithmic time derivative of the MSD lies between zero, corresponding to elastic confinement, and one, corresponding to viscous diffusion (39,46). Assuming a local power law form for MSD, elastic  $G'(\omega)$  and viscous  $G''(\omega)$  moduli are given by (39,46)

$$G'(\omega) = G(\omega) \cos \left[ \frac{\pi \alpha(\omega)}{2} \right], \quad (2)$$

$$G''(\omega) = G(\omega) \sin \left[ \frac{\pi \alpha(\omega)}{2} \right], \quad (3)$$

where

$$G(\omega) = \frac{2k_B T}{3\pi R \langle \Delta r^2(1/\omega) \rangle \Gamma[1 + \alpha(\omega)]}. \quad (4)$$

In [Eq. 4](#),  $\langle \Delta r^2(1/\omega) \rangle$  is the magnitude of  $\langle \Delta r^2(t) \rangle$  evaluated at  $t = 1/\omega$ . The value  $\Gamma$  denotes the  $\gamma$ -function. The value  $\alpha(\omega)$  is the exponent of the local power law, determined from the logarithmic time derivative of the MSD:  $\alpha(\omega) = \partial \ln[\langle \Delta r^2(t) \rangle] / \partial \ln[t]_t = 1/\omega$ .

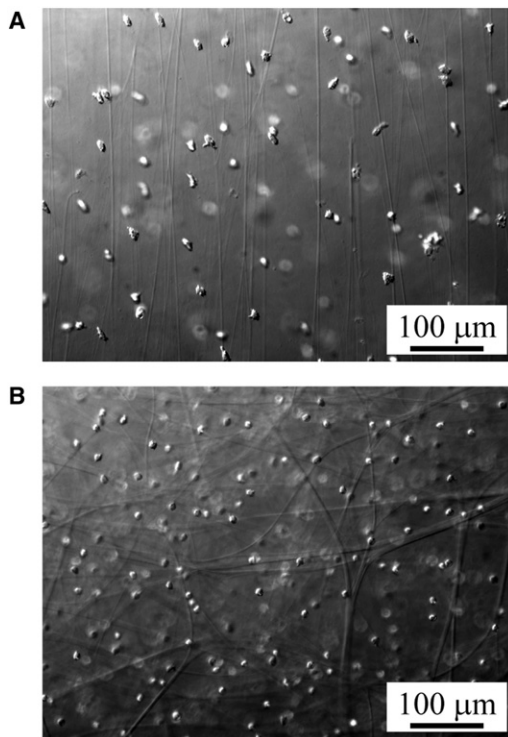
## RESULTS

### Visualization of the thick fibers in the mesoglea

The thick vertical fibers could easily be revealed by DIC microscopy in hand-cut sections of outer mesoglea (mesoglea



between the endoderm and the exumbrella). The outer mesoglea is traversed by radially arranged fibers, as described in other species of jellyfish (7,12,15,18). Weber and Schmid (15) described in detail the fibrous system of the ECM of hydromedusa *Polyorchis penicillatus*. We found the same architecture of the fibrous system in adult *A. aurita* (Fig. 1): thick vertical fibers run perpendicularly from the exumbrellar side and impinge on the endoderm (Fig. 2 A) and near the exumbrellar surface the fibers branch and penetrate a plexus of fibers that run tangentially in all directions (Fig. 2 B). In juveniles the resolution of DIC microscopy was too low, but we could occasionally observe in vivo parts of the thick fiber structures. In Fig. 2, A and B, apart from the thick fibers, many mesogleal cells, randomly distributed, can be observed. The thick fibers vary in diameter (up to 12  $\mu\text{m}$ ). They are anchored in a three-dimensional network of fine fibrils that fills the entire volume of the mesogleal ECM. This fine fibrous structure is transparent by light microscopy but can be revealed by SEM.

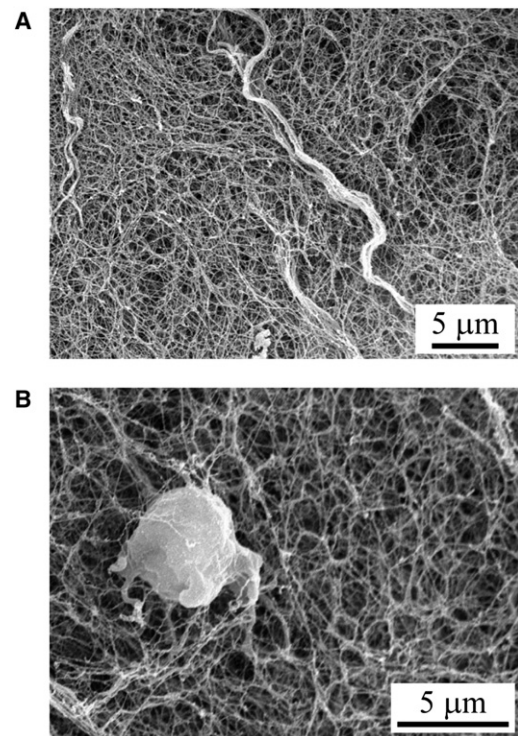


**FIGURE 2** Thick fibers of the ECM. Hand-cut sections of adult jellyfish mesoglea were visualized by DIC microscopy. The thick fibers of the ECM and numerous randomly distributed mesogleal cells can be observed. (A) Thick vertical fibers and mesogleal cells. The slice of mesoglea was cut lateral along the oral-aboral axis, in the middle of the mesoglea, ~1–2 mm above the endoderm. The thick vertical fibers are parallel and run perpendicularly from the exumbrellar side. (B) Thick tangential fibers and mesogleal cells. The slice of mesoglea was cut perpendicularly to the oral-aboral axis, ~10  $\mu\text{m}$  under the exumbrella. The thick tangential fibers run tangentially in all directions, near the exumbrellar surface.

## Visualization of the fine fibers in the mesoglea

Because of the large quantity of water in the mesoglea, the samples underwent a noticeable shrinkage (with a ratio of ~2) occurring during fixation, dehydration, and especially during critical-point drying. For this reason, the mesh size of the mesogleal fibrous network may be smaller in SEM observations than in vivo and the fiber diameters might be slightly smaller (47,48). However, we assume that SEM observations gave reliable information on fiber structure and architecture of the fibrous network (15).

Fig. 3, A and B, shows the structure of the mesoglea of juvenile jellyfish visualized by SEM, in the thick vertical fibers region. As can be observed in Fig. 3 A, the thick fibers stick out of the network of fine fibrils and are woven together by many fibrils of the three-dimensional network; this was also observed by Weber and Schmid (15) in *P. penicillatus*. Fig. 3 B shows a mesogleal cell embedded in the fine network of fibrils. The SEM images show that the fibrils are randomly and heterogeneously distributed. Moreover, the size of the fibrous mesh is variable. A similar fibrous organization was observed on pieces of mesoglea cut from adult jellyfish.



**FIGURE 3** Scanning electron micrographs of the mesoglea of juvenile jellyfish in the middle of the mesoglea, ~100–400  $\mu\text{m}$  above the endoderm. (A) Thick fibers emerging from the three-dimensional network of fine fibrils. The thick fibers are woven together by many fibrils of the three-dimensional network. The fibrils are randomly and heterogeneously distributed and the size of the fibrous mesh is very variable. A similar fibrous organization was observed on pieces of mesoglea cut from adult jellyfish. (B) A mesogleal cell embedded in the fine network of fibrils.

## Macrorheology experiments

The experiments were performed on 18 different slices of mesoglea, cut from six different adult jellyfish. All the slices were extracted from the same functional network region, characterized by the thick vertical fibers architecture.

The frequency dependence of the elastic ( $G'$ ) and viscous ( $G''$ ) moduli was obtained by measuring the stress response from sinusoidal strain variations (amplitude 0.3%) with frequencies varying from 0.13 to 20 rad/s. Each sample showed the same kind of behavior:  $G'$  was higher than  $G''$ , and  $G'$  slightly increased with frequency. We observed a relatively small sample-to-sample variation in the measurements of elastic and viscous moduli. The averaged viscous and elastic moduli (averaged over the 18 samples) were plotted as a function of frequency (Fig. 4); the bars represent the standard deviation. The observed frequency dependence of the viscoelastic moduli shows that the mesoglea behaves like a viscoelastic material (36). Between 1 and 20 rad/s,  $G'$  and  $G''$  increase with frequency with a power law behavior, with an identical power law exponent ( $\sim 0.16$ ). Such power law behaviors, characteristic of a gel, were observed in various polymer networks (49), including biopolymers (50).

Megill et al. (12) measured the compressive stiffness of the mesoglea of *P. penicillatus* and found that the mean Young's modulus was  $\sim 340$  Pa. An exact comparison with our macrorheological measurements is not possible, but a rough estimate can be made when considering the mesoglea as a purely elastic isotropic and incompressible material. The value of the elastic modulus  $G'$  would then be one-third of the Young's modulus:  $G'$  is  $\sim 110$  Pa. Although we measured a smaller elastic modulus ( $\sim 20$  Pa at  $\omega = 1$  rad/s) in *A. aurita*, the order of magnitude is in agreement with our measurements. The differences in the mechanical properties can be related to the differences in size and shape

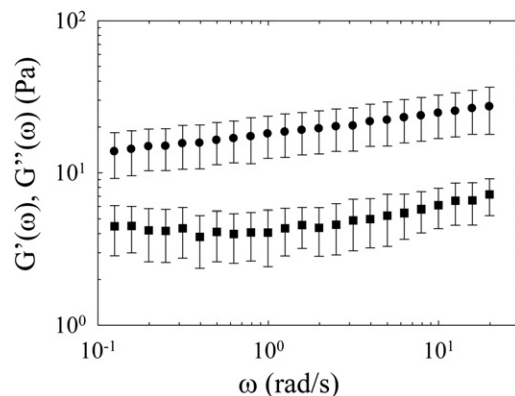


FIGURE 4 Macrorheological measurements. The frequency dependence of the averaged elastic (*circles*) and viscous (*squares*) moduli of mesoglea slices of adult jellyfish were obtained at the macroscopic scale using a shear rheometer. The average was performed over 18 different slices of mesoglea. (*Bars*) Standard deviation due to the dispersion of the measurements. At macroscopic scale, the mesoglea behaves like a viscoelastic gel.

between *P. penicillatus* and *A. aurita*, leading to somewhat different fibrous organizations (15) and mechanical properties: *A. aurita* is an oblate jellyfish and *P. penicillatus* a jellyfish with a torpedo shape (12).

## Microrheology experiments

Microrheology experiments were performed on 30 juvenile jellyfish and 6 adult jellyfish. The microbeads were systematically injected in the same functional network region, characterized by the thick vertical fibers architecture far from the cellular sheets and tangential big fibers.

### Juvenile jellyfish

Fig. 5 A shows the result from a typical experiment in the mesoglea of a juvenile jellyfish. The MSD as a function of the lag time for 11 different beads is represented. These beads were microinjected in the mesoglea and visualized one day after injection. The MSD is plotted in log-log scale and the local slopes of all curves are  $< 1$ : the beads perform subdiffusive motions. This means that each bead probes a viscoelastic medium (45), which is consistent with macrorheological measurements. However, the most striking pattern is the diversity of microbeads behaviors: when viewing the specimen, they showed various Brownian motions. Some of them moved much more than others, as reflected by the diversity of MSD curves shown in Fig. 5 A; the higher MSD corresponded to the more mobile beads. These local variations of the microbeads behaviors implicate that the fine fiber network of the jellyfish ECM is very heterogeneous at the micron scale. This spatial heterogeneity is consistent with SEM observations (Fig. 3 A), revealing important local variations of the fibrous organization.

### Adult jellyfish

Fig. 5 B shows the result from a typical experiment in the mesoglea of an adult jellyfish. The MSD as a function of the lag time for 13 different beads is represented. As observed in juvenile jellyfish, all the beads performed a subdiffusive motion, revealing a surrounding viscoelastic medium, and the MSD of the beads were drastically different from one probe to another. However, it should be noticed that the dispersion of the observed MSD is larger in the mesoglea of adult jellyfish than in juvenile ones. In the fibrous network of adult jellyfish, some of the beads show little Brownian motion; the MSD of these probes is very low ( $< 10^{-4} \mu\text{m}^2$ ) and almost constant during time. It has been checked that their motions are above the resolution limit of the detection system. These beads were tightly trapped in the fibrous network and their MSD reflected the nearly purely elastic response of the cage in which they were embedded at the probe length-scale. The other beads moved more freely and their MSD are comparable to those observed in the mesoglea of juvenile jellyfish.

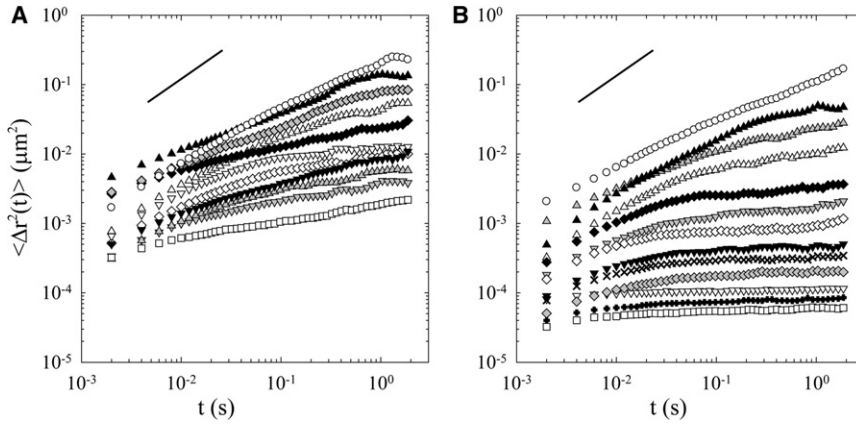


FIGURE 5 Microrheological measurements. Time-averaged MSD of 1- $\mu\text{m}$  microbeads embedded in the mesogleal ECM as a function of the lag time. The microprobes were injected and visualized together and each symbol represents the MSD of a different microbead. (Solid line in each panel) Slope of 1. The dispersion of MSD curves shows that the fibrous network of jellyfish ECM is very heterogeneous at the micron scale. (A) MSD of microprobes injected in the mesoglea of a juvenile jellyfish. (B) MSD of microprobes injected in the mesoglea of an adult jellyfish. The dispersion of MSD curves is more important in adult jellyfish than in juvenile ones. Some of the beads enhance a very tiny Brownian motion. They explore stiff microenvironments of the ECM. The other beads move more freely and their MSD are comparable to those observed in the mesoglea of juvenile jellyfish.

### Viscoelastic moduli at macro- and microscales

Macrorheology and microrheology experiments were performed in the mesoglea of adult jellyfish. To compare these rheological measurements performed at different scales, frequency-dependent viscoelastic moduli were calculated from the MSD of the beads, following Eq. 4 (see [Material and Methods](#)). Equation 4 has been established for a homogeneous medium, and  $\langle \Delta r^2(1/\omega) \rangle$  should be evaluated by an average over the MSD of several beads, i.e., evaluated at  $t = 1/\omega$ . However, jellyfish ECM was highly heterogeneous as reflected by the dispersion of MSD curves (Fig. 5 B). In such heterogeneous medium, the dispersion of MSD reflects a dispersion of local viscoelastic moduli (34). Thus,  $\langle \Delta r^2(1/\omega) \rangle$  was evaluated for each bead independently (34). However,  $\langle \Delta r^2(1/\omega) \rangle$  was only calculated at short lag time ( $t < 2$  s,  $\omega > 3.14$  rad/s), so that the time-average is sufficient to maintain reliable statistics for the calculation of the viscoelastic moduli at the local microscale.

Fig. 6 shows the average viscoelastic moduli  $G'$  and  $G''$  at macroscopic scale, placed in context with calculated  $G'$  and  $G''$  at microscopic scale.  $G'$  and  $G''$  at microscopic scale were calculated from the MSD of two different microbeads, showing very different behaviors: a first bead moving very little and a second one that was very mobile. In Fig. 5 B, the MSD of the bead moving very little (slow motion) was plotted with open squares and the MSD of the very mobile bead (fast motion) was plotted with open circles. The orders of magnitude of the elastic and viscous moduli measured with a shear rheometer were close to those calculated from the beads moving very little, tightly embedded in the fibrous network (Fig. 6). However, the more freely moving beads explored much softer microenvironments (with lower viscoelastic moduli). At a macroscopic scale, the mesoglea appeared to be stiffer than numerous microenvironments of its fibrous structure.

### DISCUSSION

Rheological properties of jellyfish mesoglea were measured at different scales. We found that the ECM behaved as a viscoelastic gel at the macroscopic scale and as a much softer and heterogeneous viscoelastic structure at the microscopic scale. In addition, DIC microscopy techniques revealed the architecture of thick fibers traversing the ECM. SEM experiments showed that the small fibrils were randomly and heterogeneously distributed. Finally, we investigated the evolution of the microrheological properties of the ECM at different stages of jellyfish development and

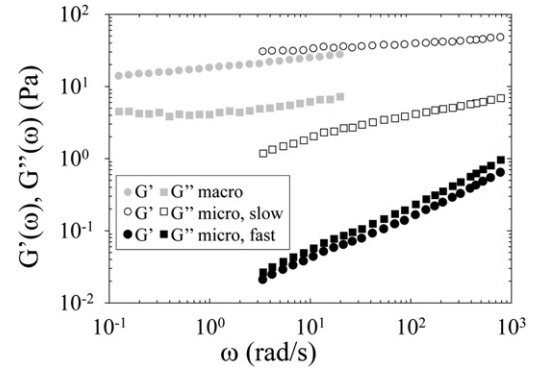


FIGURE 6 Viscoelastic moduli at macroscopic and microscopic scales. Viscoelastic moduli  $G'$  and  $G''$  were obtained from macrorheology and microrheology experiments in adult jellyfish ECM. (Circles)  $G'$ ; (squares)  $G''$ . (Shaded symbols) The moduli  $G'$  and  $G''$  at macroscopic scale, obtained with a shear rheometer.  $G'$  and  $G''$  at microscopic scale were calculated from the MSD curves of two different microbeads: a bead moving very little (slow) and a very mobile bead (fast). (Open symbols)  $G'$  and  $G''$  calculated from the MSD of the probe that moved very little. (Solid symbols)  $G'$  and  $G''$  calculated from the MSD of the very mobile bead. The different behaviors of these two beads correspond to different local viscoelastic moduli. The orders of magnitude of the elastic and viscous moduli measured with a shear rheometer are close to those calculated from the bead moving very little. The more freely moving bead explores a much softer microenvironment (with lower viscoelastic moduli).



measured that the ECM in adult jellyfish was locally stiffer than in juvenile ones.

### Limitations of microrheology technique

We measured the mechanical properties of the mesoglea at the microscale by injecting microbeads in the jellyfish ECM and subsequently tracking their Brownian motion. The drawback of this technique is that the injection procedure is invasive and may damage locally the fibrous network. However, the Brownian motion of the microbeads was observed one day after injection. We measured that the Brownian motion of the microbeads was more constrained one day after injection than immediately after injection and remained similar at different time points during the subsequent four days. We interpret these results as a local embedding of each bead in the mesogleal fibrous network, occurring progressively, and well achieved one day after injection. We assume that during one day, the seawater injected with the beads could progressively diffuse, the ECM is restored locally, and the microbeads are embedded in the ECM. The advantage of this technique is that microbeads, introduced within the jellyfish, are put in contact with the ECM; its mechanical properties can then be probed directly and locally.

### Mesoglea and collagen gels

The mesoglea gel of *A. aurita* is a fibrous system and is partly composed of collagen fibers. Collagen fibers in Cnidaria are found to resemble different vertebrate collagen types. Miura and Kimura (51) found chemically alike collagen Type V in the jellyfish *Stomolophus nomuria*. Analogs to collagen Type I, II, and IV were found in different species of hydra (9,52). To our knowledge, the collagen chains in *A. aurita* were not chemically identified.

Our macrorheological results on the ECM of *A. aurita* were similar to those obtained in Type-I reconstituted collagen gels (36,53,54). Their values of the viscoelastic moduli were in the same range as the values we measured. They likewise showed that the elastic modulus ( $G'$ ) was higher than the viscous one ( $G''$ ), with  $G'$  increasing slightly with frequency. Furthermore, they found comparable power law behavior for viscoelastic moduli. Indeed, we measured in the mesoglea, between 1 and 20 rad/s, that  $G'$  and  $G''$  increased with frequency with a power law exponent at  $\sim 0.16$ . This exponent is in the same range as power law exponents measured in Type-I reconstituted collagen gels in the same frequency domain: Knapp et al. (53) measured a power law exponent at  $\sim 0.13$  and Velegol and Lanni (36) at  $\sim 0.15$ .

Velegol and Lanni (36) and Parekh and Velegol (55) also determined the elastic moduli of Type-I collagen gel at microscopic scale using laser trap microrheometry. They measured important variations in elastic moduli from posi-

tion to position, revealing high heterogeneity of two orders of magnitude at micron scale. (Note that we have found, for the elastic component ( $G'$ ), an even larger heterogeneity of three orders of magnitude for adult jellyfish (Fig. 6) and a somewhat smaller heterogeneity for juvenile jellyfish.

The fibrous system of the jellyfish mesoglea, however, is not composed only of collagen fibers, but also contains proteins such as fibrillin that form elastic fibers (12). Hsu et al. (54) measured the viscoelastic properties of collagen gels to which  $\sim 10\%$  of elastic proteins (elastin) were added. At  $25^\circ\text{C}$ , they did not find a significant difference between elastin-containing gels and pure collagen gels. In all, from a rheological point of view, the mesoglea shows similarities with a simple collagen gel.

### Mesoglea at macroscopic and microscopic scales

The mesogleal fibrous network is traversed by thick vertical fibers anchored in a three-dimensional network of fine fibrils as shown before by others (6–8,12,15) and as is shown in Figs. 2 and 3. Weber and Schmid (15) described the ECM of the mesoglea as a flexible foam mattress strengthened by vertical struts. Microrheology experiments primarily probe the mechanical properties of the fine fibrils meshwork, whereas macrorheology experiments measure the viscoelastic properties of the whole mesoglea, including the thick fibers. These experiments show that the network of fine fibrils is very soft and heterogeneous and that the stiffness of the mesoglea must be insured essentially by the architecture of thick fibers that structure the mesoglea. In contrast, for cellular migration and morphogenesis, the soft viscoelastic microenvironment plays likely a significant role.

### Swimming and mesogleal deformations

In addition to maintaining the radial integrity, the thick vertical fibers also play a role during swimming. *A. aurita* swim with a combined jet-paddling mode of propulsion (17). During the contraction phase, the muscles located in the subumbrella contract predominantly circumferentially, which compress and shear the mesoglea in the plane perpendicular to the oral-aboral axis and elongate it along the oral-aboral axis (18). Although the mesogleal deformations during swimming are complex, the natural shearing plane during swimming corresponds to the shearing plane used in macrorheological experiments. At the frequency of muscle contractions ( $\sim 1$  rad/s), macrorheological results (Fig. 4) show that the mesoglea is much more elastic than viscous ( $G'$  is 10-times higher than  $G''$ ). Although the microstructure contains viscous microenvironments (Fig. 6), the macrostructure is nearly purely elastic, which confirms (8,12,15,18) that the energy stored in the bell after muscle contractions can be released essentially elastically.

## Aging of jellyfish ECM

Each contraction of the bell may cause a significant radial compression of the fibrous plexus, leading to a lengthening of the fiber network. The stress caused by repetitive muscular contractions progressively shapes the fibrous architecture of the ECM, leading to the formation of the thick vertical fibers architecture (15).

Observations of juvenile and adult jellyfish revealed indeed that the thick fibers are much thinner in juvenile jellyfish than in adult ones. In addition, SEM observations showed that thick fibers are woven together by the fine fibrils of the ECM (Fig. 3 A), which was also observed by Weber and Schmid (15). For reconstituted Type-I collagen gel it was shown that collagen fibers align along tensional stresses (55,56), set out at the fibril level, after which they gradually form larger fibers. These results suggest that during aging of the jellyfish ECM, the fine meshwork of fibrils progressively aggregates and forms thick fibers, which thicken gradually with time.

In our microrheology experiments, beads probing stiff microenvironments in adult jellyfish must be trapped between densely packed thick fibers. The other beads move more freely in the ECM and their MSD are very similar in adult and juvenile jellyfish. It seems that these more freely moving beads explore microenvironments in the loose mesh of fine fibers that are not aggregated. The progressive stiffening of the ECM occurring at microscopic scale is assumed to reflect the aging of the jellyfish mesoglea.

Furthermore, no differences in the microrheology results of the juvenile jellyfish could be observed when ECM was probed with the microbeads up to four days of swimming after injection. This implies that mechanical stiffening of the microenvironments due to the gradual intertwining of the fibers is significantly observable at long timescales, likely in the order of several weeks.

## CONCLUSION

The rheological properties of the ECM of the jellyfish mesoglea were measured at macroscopic and microscopic scales. Whereas the ECM behaved as a viscoelastic gel at the macroscopic scale, it proved to be a much softer and heterogeneous viscoelastic structure at the cellular scale, the scale at which morphogenetic processes occur. The fibrous architecture of the mesoglea observed by differential interference contrast and scanning electron microscopy was in agreement with our measurements of the mechanical properties of the ECM at macroscopic and microscopic scales.

Formation of this fiber network architecture proved to be a dynamical process: microrheology experiments performed on juvenile and adult jellyfish revealed a progressive stiffening of microenvironments in the ECM by a gradual aggregation of fibers. This aggregation of fibers is likely to be

enhanced by the repetitive muscular contractions of the jellyfish, shaping the fibrous architecture of the ECM progressively during aging.

## SUPPORTING MATERIAL

Details of the injection and microrheology experimental procedure, control experiments, and three figures are available at [http://www.biophysj.org/biophysj/supplemental/S0006-3495\(11\)05355-0](http://www.biophysj.org/biophysj/supplemental/S0006-3495(11)05355-0).

The authors thank David Montero for the SEM images in Fig. 3, A and B, Matthieu Receveur for his technical help, and Nicolas Cagnon, Pierre-Yves Bouis, and the team from La Cité de la Mer in Cherbourg, France, who taught us how to rear jellyfish.

This work was supported by grants (Programme Interdisciplinaire de Recherche and Projet Exploratoire) from the Centre National de la Recherche Scientifique and by a grant (Bonus Qualité Recherche) from the University Paris Diderot.

## REFERENCES

1. Discher, D. E., P. Janmey, and Y. L. Wang. 2005. Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science* 310:1139–1143.
2. Saez, A., M. Ghibaudo, ..., B. Ladoux. 2007. Rigidity-driven growth and migration of epithelial cells on microstructured anisotropic substrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104:8281–8286.
3. Baker, E. L., R. T. Bonnecaze, and M. H. Zaman. 2009. Extracellular matrix stiffness and architecture govern intracellular rheology in cancer. *Biophys. J.* 97:1013–1021.
4. Levental, I., P. C. Georges, and P. A. Janmey. 2007. Soft biological materials and their impact on cell function. *Soft Matter* 3:299–306.
5. Ingber, D. E. 2002. Mechanical signaling and the cellular response to extracellular matrix in angiogenesis and cardiovascular physiology. *Circ. Res.* 91:877–887.
6. Bouillon, J., and G. Coppo. 1977. Comparative study of mesoglea of cnidarians. *Cah. Biol. Mar.* 18:339–368.
7. Chapman, G. 1953. Studies of the mesoglea of coelenterates. 1. Histology and chemical properties. *Q. J. Microsc. Sci.* 94:155–176.
8. Chapman, G. 1959. The mesoglea of *Pelagia noctiluca*. *Q. J. Microsc. Sci.* 100:599–610.
9. Shimizu, H., R. Aufschnaiter, ..., X. Zhang. 2008. The extracellular matrix of hydra is a porous sheet and contains type IV collagen. *Zoology (Jena)* 111:410–418.
10. Russel, F. S. 1970. The Medusae of the British Isles. Vol. II. Pelagic Scyphozoa, with a supplement to Vol. I. Cambridge University Press, London, UK.
11. Reber-Müller, S., T. Spissinger, ..., V. Schmid. 1995. An extracellular matrix protein of jellyfish homologous to mammalian fibrillins forms different fibrils depending on the life stage of the animal. *Dev. Biol.* 169:662–672.
12. McGill, W. M., J. M. Gosline, and R. W. Blake. 2005. The modulus of elasticity of fibrillin-containing elastic fibers in the mesoglea of the hydromedusa *Polyorchis penicillatus*. *J. Exp. Biol.* 208:3819–3834.
13. Shaposhnikova, T., I. Matveev, ..., O. Podgornaya. 2005. Mesogleal cells of the jellyfish *Aurelia aurita* are involved in the formation of mesogleal fibers. *Cell Biol. Int.* 29:952–958.
14. Denton, E. J. 1963. Buoyancy mechanisms of sea creatures. *Endeavour* 22:3–8.
15. Weber, C., and V. Schmid. 1985. The fibrous system in the extracellular matrix of hydromedusae. *Tissue Cell* 17:811–822.

16. Nawroth, J. C., K. E. Feitl, ..., J. O. Dabiri. 2010. Phenotypic plasticity in juvenile jellyfish medusae facilitates effective animal-fluid interaction. *Biol. Lett.* 6:389–393.
17. Dabiri, J. O., S. P. Colin, and J. H. Costello. 2007. Morphological diversity of medusan lineages constrained by animal-fluid interactions. *J. Exp. Biol.* 210:1868–1873.
18. Gladfelt, W. B. 1972. Structure and function of locomotory system of *Polyorchis montereyensis* (Cnidaria, Hydrozoa). *Helgol. Wiss. Meeresunters.* 23:38–79.
19. Schmid, V., A. Bally, ..., C. Weber. 1991. The extracellular matrix (mesoglea) of hydrozoan jellyfish and its ability to support cell-adhesion and spreading. *Hydrobiologia* 216:3–10.
20. Sarra, Jr., M. P., X. M. Zhang, ..., D. R. Abrahamson. 1993. Extracellular matrix (mesoglea) of *Hydra vulgaris* III. Formation and function during morphogenesis of hydra cell aggregates. *Dev. Biol.* 157:383–398.
21. Frank, U., and B. Rinkevich. 1999. Scyphozoan jellyfish's mesoglea supports attachment, spreading and migration of anthozoans' cells in vitro. *Cell Biol. Int.* 23:307–311.
22. Shimizu, H., X. M. Zhang, ..., M. P. Sarra, Jr. 2002. Epithelial morphogenesis in hydra requires de novo expression of extracellular matrix components and matrix metalloproteinases. *Development* 129:1521–1532.
23. Kleinman, H. K., D. Philp, and M. P. Hoffman. 2003. Role of the extracellular matrix in morphogenesis. *Curr. Opin. Biotechnol.* 14:526–532.
24. Tucker, R. P., B. Shibata, and T. N. Blankenship. 2011. Ultrastructure of the mesoglea of the sea anemone *Nematostella vectensis* (Edwardsiidae). *Invertebr. Biol.* 130:11–24.
25. Alexander, R. M. 1964. Viscoelastic properties of mesoglea of jellyfish. *J. Exp. Biol.* 41:363–369.
26. MacKintosh, F. C., and C. F. Schmidt. 1999. Microrheology. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 4:300–307.
27. Breedveld, V., and D. J. Pine. 2003. Microrheology as a tool for high-throughput screening. *J. Mater. Sci.* 38:4461–4470.
28. Abou, B., C. Gay, ..., S. Gorb. 2010. Extensive collection of femtoLiter pad secretion droplets in the beetle *Leptinotarsa decemlineata* allows nanoliter microrheology. *J. R. Soc. Interface* 7:1745–1752.
29. Weihs, D., T. G. Mason, and M. A. Teitell. 2006. Bio-microrheology: a frontier in microrheology. *Biophys. J.* 91:4296–4305.
30. Massiera, G., K. M. Van Citters, ..., J. C. Crocker. 2007. Mechanics of single cells: rheology, time dependence, and fluctuations. *Biophys. J.* 93:3703–3713.
31. Daniels, B. R., C. M. Hale, ..., D. Wirtz. 2010. Differences in the microrheology of human embryonic stem cells and human induced pluripotent stem cells. *Biophys. J.* 99:3563–3570.
32. Fabry, B., G. N. Maksym, ..., J. J. Fredberg. 2001. Scaling the microrheology of living cells. *Phys. Rev. Lett.* 87:148102.
33. Valentine, M. T., P. D. Kaplan, ..., D. A. Weitz. 2001. Investigating the microenvironments of inhomogeneous soft materials with multiple particle tracking. *Phys. Rev. E* 64:061506.
34. Tseng, Y., T. P. Kole, and D. Wirtz. 2002. Micromechanical mapping of live cells by multiple-particle-tracking microrheology. *Biophys. J.* 83:3162–3176.
35. Ziemann, F., J. Rädler, and E. Sackmann. 1994. Local measurements of viscoelastic moduli of entangled actin networks using an oscillating magnetic bead micro-rheometer. *Biophys. J.* 66:2210–2216.
36. Velegol, D., and F. Lanni. 2001. Cell traction forces on soft biomaterials. I. Microrheology of type I collagen gels. *Biophys. J.* 81:1786–1792.
37. Mason, T. G., and D. A. Weitz. 1995. Optical measurements of frequency-dependent linear viscoelastic moduli of complex fluids. *Phys. Rev. Lett.* 74:1250–1253.
38. Palmer, A., J. Xu, ..., D. Wirtz. 1999. Diffusing wave spectroscopy microrheology of actin filament networks. *Biophys. J.* 76:1063–1071.
39. Mason, T. G. 2000. Estimating the viscoelastic moduli of complex fluids using the generalized Stokes-Einstein equation. *Rheol. Acta* 39:371–378.
40. Kroiher, M., B. Siefker, and S. Berking. 2000. Induction of segmentation in polyps of *Aurelia aurita* (Scyphozoa, Cnidaria) into medusae and formation of mirror-image medusa anlagen. *Int. J. Dev. Biol.* 44:485–490.
41. Chapman, D. M. 1999. Microanatomy of the bell rim of *Aurelia aurita* (Cnidaria: Scyphozoa). *Can. J. Zool. Revue Can. Zool.* 77:34–46.
42. Litke, L. L., and F. N. Low. 1977. Fixative tonicity for scanning electron microscopy of delicate chick embryos. *Am. J. Anat.* 121–127.
43. Rasband, W. S. 1997–2007 ImageJ. US National Institutes of Health, Bethesda, MD. <http://rsb.info.nih.gov/ij/>. (Source code for the plug-in is available at [http://www.msc.univparis.diderot.fr/~olivier/ImageJ/tracker\\_Install.zip](http://www.msc.univparis.diderot.fr/~olivier/ImageJ/tracker_Install.zip); 29/03/2009)
44. Weber, C., E. Kurz, and V. Schmid. 1987. The fibrous system of the extracellular matrix of *Podocoryne carnea* and its degradation by the subumbrellar plate endoderm demonstrated by a monoclonal antibody. *Tissue Cell.* 19:757–771.
45. Dasgupta, B. R., and D. A. Weitz. 2005. Microrheology of cross-linked polyacrylamide networks. *Phys. Rev. E* 71:021504.
46. Dasgupta, B. R., S. Y. Tee, ..., D. A. Weitz. 2002. Microrheology of polyethylene oxide using diffusing wave spectroscopy and single scattering. *Phys. Rev. E* 65:051505.
47. Parry, D. A. D., and A. S. Craig. 1977. Quantitative electron microscope observations of the collagen fibrils in rat-tail tendon. *Biopolymers* 16:1015–1031.
48. Raub, C. B., V. Suresh, ..., S. C. George. 2007. Noninvasive assessment of collagen gel microstructure and mechanics using multiphoton microscopy. *Biophys. J.* 92:2212–2222.
49. Warlus, S., and A. Ponton. 2009. A new interpretation for the dynamic behavior of complex fluids at the sol-gel transition using the fractional calculus. *Rheol. Acta* 48:51–58.
50. Rodd, A. B., J. Cooper-White, ..., D. V. Boger. 2001. Gel point studies for chemically modified biopolymer networks using small amplitude oscillatory rheometry. *Polymer (Guildf.)* 42:185–198.
51. Miura, S., and S. Kimura. 1985. Jellyfish mesoglea collagen—characterization of molecules as  $\alpha 1$ - $\alpha 2$ - $\alpha 3$  heterotrimers. *J. Biol. Chem.* 260:5352–5356.
52. Deutzmann, R., S. Fowler, ..., M. P. Sarra, Jr. 2000. Molecular, biochemical and functional analysis of a novel and developmentally important fibrillar collagen (Hcol-I) in hydra. *Development* 127:4669–4680.
53. Knapp, D. M., V. H. Barocas, ..., R. T. Tranquillo. 1997. Rheology of reconstituted type I collagen gel in confined compression. *J. Rheol.* 41:971–993.
54. Hsu, S., A. M. Jamieson, and J. Blackwell. 1994. Viscoelastic studies of extracellular matrix interactions in a model native collagen gel system. *Biorheology* 31:21–36.
55. Parekh, A., and D. Velegol. 2007. Collagen gel anisotropy measured by 2-D laser trap microrheometry. *Ann. Biomed. Eng.* 35:1231–1246.
56. Vader, D., A. Kabla, ..., L. Mahadevan. 2009. Strain-induced alignment in collagen gels. *PLoS ONE* 4:e5902.

## Supporting Material for

### Micro- and macrorheology of jellyfish extracellular matrix

Camille Gambini, Bérengère Abou, Alain Ponton, and Annemiek J. M. Cornelissen

## Microrheology experimental procedure

### Injection procedure

A home-made micropipette with a tip size of a few microns was used to inject the microspheres in the jellyfish mesoglea. The micropipette was pulled from thin-wall borosilicate glass capillaries with a 1 mm outer diameter and a 0.58 mm inner diameter (GC100-15, Harvard Apparatus, Les Ulis, France) with a Narishige PB-7 double-stage puller (Narishige, Tokyo, Japan). The micropipette was mounted on a pressure device (CellTram Oil, Eppendorf, Le Pecq, France) and guided with a joystick micromanipulator (MN-151, Narishige) attached to the inverted Leica microscope.

Details of the injection procedure are shown in Fig. S1. Juvenile jellyfish were anesthetized during 10 min in 7.5%  $\text{MgCl}_2$  diluted with an equal volume of seawater (1). They were then put on a glass cover slip, the umbrella lying flat, and the subumbrella in contact with the cover slip. This position of the jellyfish allowed penetrating the needle through the exumbrella. The subsequent injury was limited and could be easily repaired by the jellyfish. In contrast, injection via the subumbrella would have damaged the muscle fibres and the endodermal gastrovascular system.

A few nanolitres of microbead suspension was injected, corresponding to a few hundred microbeads. To prevent the jellyfish from drying, each injection was performed as quickly as possible (10 min). The beads were injected about 200  $\mu\text{m}$  above the subumbrella (corresponding to a distance of about 100  $\mu\text{m}$  above the endoderm), so that they were well embedded in the mesoglea (far from cellular sheets) and could be viewed by an immersion objective. A glycerine immersion objective (PL APO 63X/1.30 GLYC CORR, Leica), with 63 magnification, a numerical aperture of 1.30 and a working distance of 280  $\mu\text{m}$ , was chosen to visualize *in vivo* the microbeads embedded in the mesoglea and to track their Brownian motion.

### Microbeads observations

After injection, the jellyfish were replaced in artificial seawater, where they swam freely during one day before any measurement of the motion of the beads. Microrheology results obtained one day or several days after injection were similar: all the beads performed subdiffusive motions and no beads were found to explore pure seawater microenvironment. Thus, it was verified that diffusion of the injected seawater and local embedding of each bead in the mesogleal fibrous network were well



achieved one day after injection. Besides, we verified that the microinjection process did not affect normal morphology and behaviour of the jellyfish.

For the microrheological measurements, the jellyfish were put on a glass cover slip, in the same position as for the injection: the umbrella was lying flat and the subumbrella was in contact with the cover slip. To avoid evaporation during the experiment, the jellyfish was put in a home-made closed chamber. The set up was mounted on a damped optical table in order to reduce noise in microbeads tracking experiments. The fluorescence of the microbeads allowed us to easily retrace the original place of injection. Some of the injected beads were phagocytised by the mesogleal cells, which are capable of amoeboid movements and active phagocytosis (2), but most of them were still in the ECM. Mesogleal cells are sphere-shaped and have a smooth cell membrane and therefore it was easy to determine if a microbead was in a mesogleal cell or in the matrix. The phagocytised microbeads were not considered for thermal motion measurements.

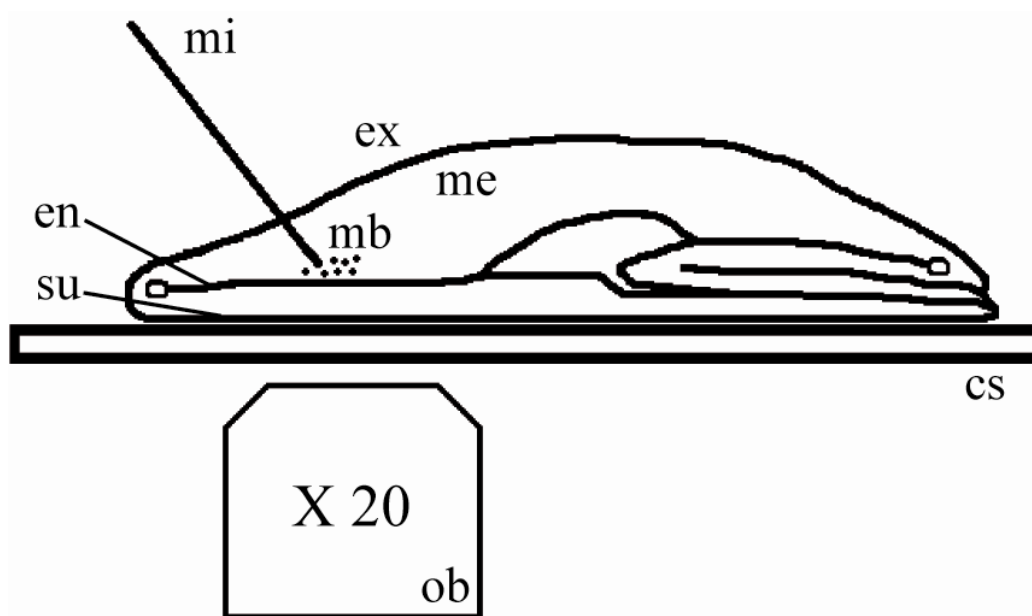


FIGURE S1 Schematic views of the set up used for *in vivo* microbeads injection in the mesoglea of an anesthetized juvenile jellyfish for microrheology experiments. For clarity, the diagram does not show actual sizes of the elements. Cover slip (cs); endoderm (en); exumbrella (ex); microbeads (mb); mesoglea (me); micropipette (mi); objective (ob); subumbrella (su).

### Particle tracking algorithm

The particle tracking algorithm enables to track the two-dimensional Brownian motion of several beads at the same time. It was implemented as an ImageJ plugin (3). The beads displacements were

determined with a classical cross-correlation method. In order to achieve sub-pixel spatial resolution, the computed correlation was interpolated using a paraboloid approximation (4).

## Microrheology control experiments

### Microrheology experiments in glycerol

During microrheology experiments, a slow sliding of the sample occurred (about 0.2  $\mu\text{m}$  per second). It could be reduced by greasing a bit the cover slip on which the jellyfish was lying. But the drift could not be suppressed totally. The mean motion of the beads, corresponding to this global drift, was calculated and subtracted for each bead. We checked this method on drifting samples of calibrated glycerol: an imposed drift during the experiment could be subtracted from the data and the purely Brownian motion of the beads could be extracted. After the drift-correction of the beads positions, the time-averaged two-dimensional MSD  $\langle \Delta r^2(t) \rangle_{t'} = \langle [x(t' + t) - x(t')]^2 + [y(t' + t) - y(t')]^2 \rangle_{t'}$  was calculated for each bead, improving the statistical accuracy. To maintain reliable statistics, the data from the MSD were kept in the range below  $t < 2s$ . Indeed, the glycerol experiments show that at longer lag times the MSD curves from the individual beads start to deviate from the average MSD curve. Microrheology experiments performed in calibrated glycerol solutions allowed to determine the spatial resolution of the experimental set up (microscope, camera and tracking software). Thermal motion measurements in glycerol and jellyfish ECM were performed under the same experimental conditions. We determined from microrheology experiments performed in glycerol solutions that our spatial resolution was about  $3 \times 10^{-5} \mu\text{m}^2$ , which is below the MSD measurements presented.

### Microrheology experiments in slices of juvenile jellyfish

The microrheological experiments presented in the manuscript on juvenile jellyfish was performed *in vivo* under anesthetised conditions to be as less invasive as possible. On the other hand, the experiments on adult jellyfish were performed on dissected slices, because the adult jellyfish are large and it is impossible to directly visualise *in vivo* the mesoglea region with the thick vertical fibres just above their endoderm (see also Fig. 1).

The differences observed in microrheological results could be a consequence of these different experimental conditions. In particular, the mesogleal slices of adult jellyfish were stored overnight at 7 °C and beads were not exposed to a dynamic moving environment. Whereas the beads in juvenile jellyfish were placed into a dynamic ECM environment exhibiting high mechanical stresses during swimming contractions. These periodical stresses could have affected the final distribution of the beads in the fibrous network of juvenile jellyfish and modified the microrheological results.

To rule out a systematic bias in beads distributions, microrheological experiments were repeated in juvenile jellyfish under the same experimental conditions as for adult jellyfish: for each of 5 juvenile jellyfish a slice of mesoglea was dissected from the middle of the mesoglea, in the thick vertical fibres region, and microbeads were injected in these slices. The samples were stored at 7°C and the thermal motion of the microbeads was recorded one day after injection at room temperature. Thereby, the experimental protocol was identical for adult and juvenile jellyfish.

Microscopic observations the day following the injection revealed that the dynamic ECM environment of juvenile jellyfish didn't seem to have affected the final distributions of the beads. This is confirmed by the microrheological measurements shown in Fig. S2. Fig. S2 A shows the result from a typical experiment in a slice of mesoglea cut from a juvenile jellyfish. Fig. S2 B shows the result from a typical experiment *in vivo* in juvenile jellyfish mesoglea. Fig. S2 B is identical to Fig. 5 A presented in the manuscript. Fig. S2 shows that microrheological results obtained in juvenile jellyfish *in vivo* and in slices of mesoglea were similar.

Thereby, we have shown that the differences observed by microrheology experiments in adult and juvenile jellyfish presented in the manuscript are not due to different experimental conditions but could be explained by a gradual fibrous aggregation.

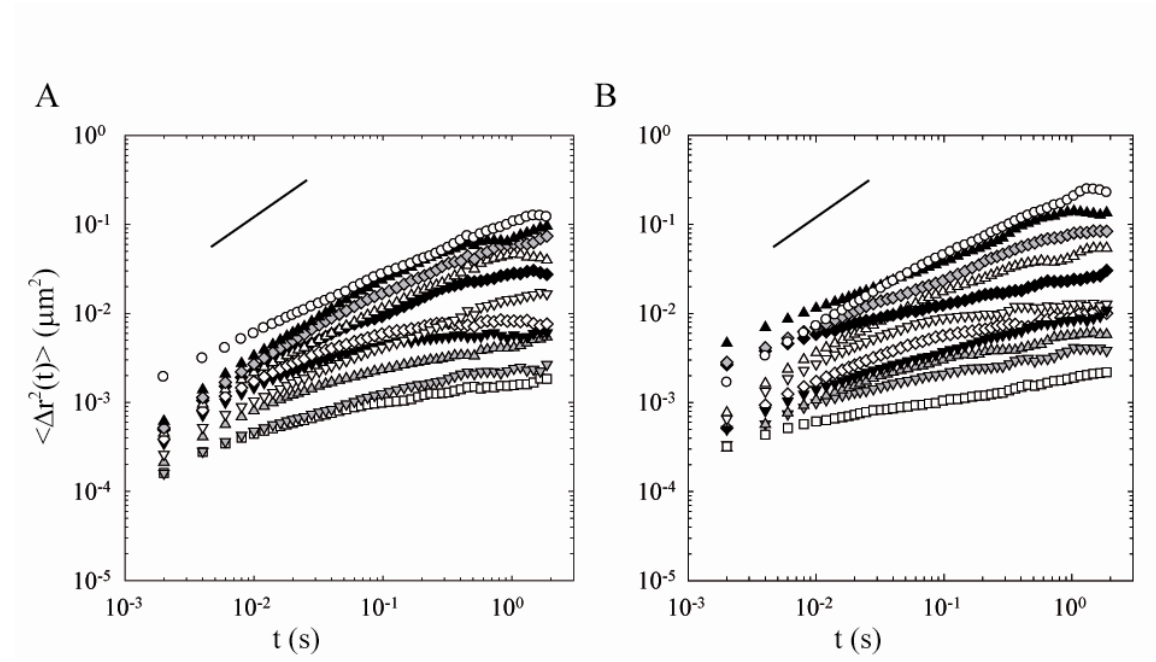


FIGURE S2 Microrheology control measurements in juvenile jellyfish. Time-averaged MSD of 1  $\mu m$  microbeads embedded in the mesogleal ECM as a function of the lag time. The microprobes were injected and visualized together and each symbol represents the MSD of a different microbead. The solid line in each figure indicates a slope of one. (A) MSD of microprobes injected and tracked in a slice of mesoglea. (B) MSD of microprobes injected and tracked *in vivo* in the mesoglea. Microrheological results obtained in static or dynamic mesogleal tissues are similar.

### Microrheology experiments with polystyrene microbeads

The surface chemistry of the beads can impact microrheological measurements. The microbeads used in our experiments were 1  $\mu m$  amine-modified fluorescent microspheres. The fluorescent properties of these beads allowed to easily retrace the original place of injection for observations one day after injection.

We verified whether the surface chemistry of the beads did not affect our microrheological measurements. We repeated microrheological measurements with 1  $\mu\text{m}$  polystyrene microbeads (4009A, Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Germany) injected in the mesoglea of 5 adult and 5 juvenile jellyfish, using the same protocol as for the amine-modified microbeads, as described in the Material and methods section of the manuscript and in the Supporting Material.

Fig. S3 shows that microrheological results are similar using either amine-modified or polystyrene microbeads, in both adult and juvenile jellyfish. Therefore it is excluded that the differences observed by microrheology experiments in adult and juvenile jellyfish are due to a possible interaction between fibres and beads surface groups, but reveal an increase in the stiffness of microenvironments in the fibrous network.

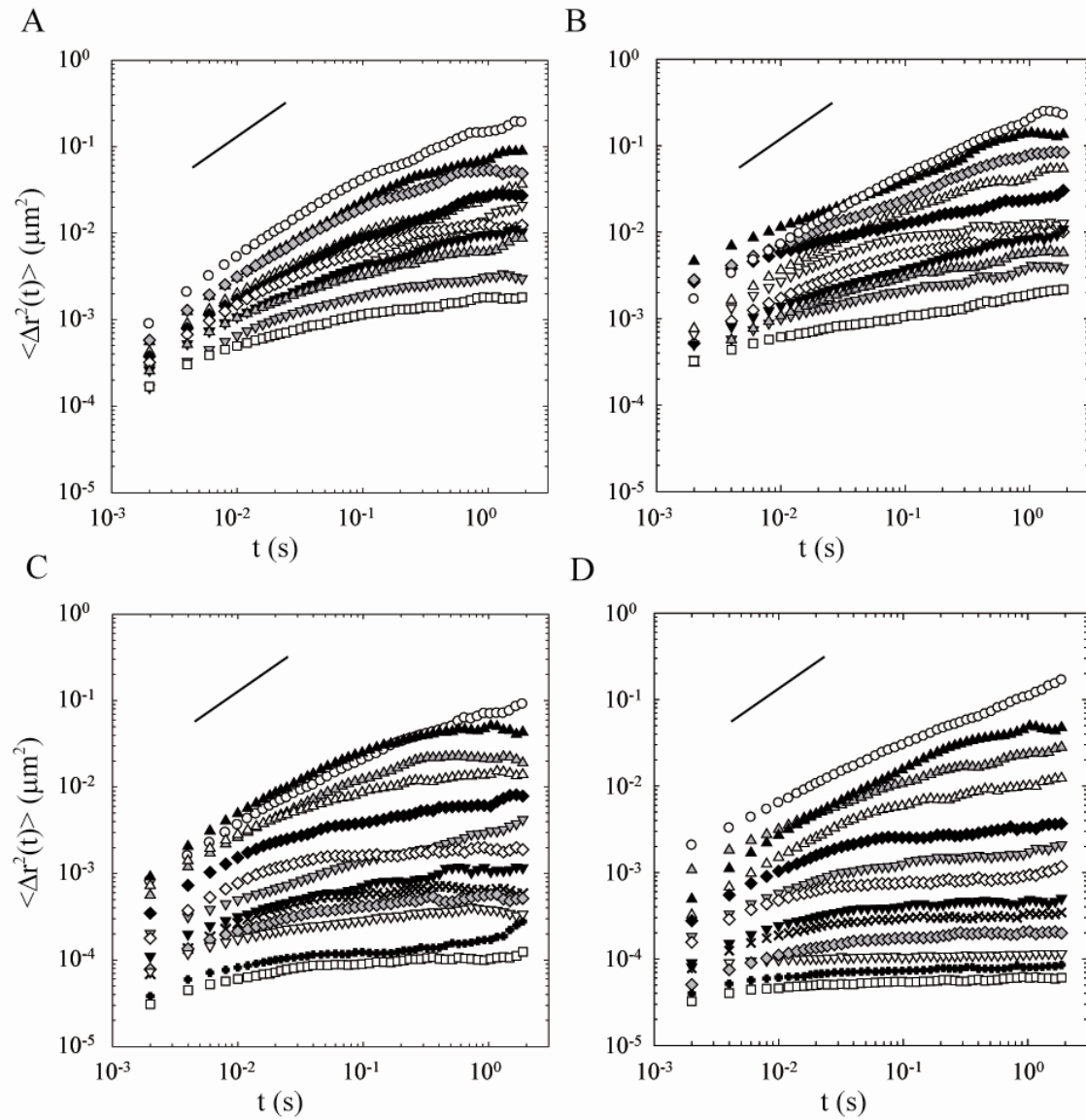


FIGURE S3      Microrheological control measurements using 1  $\mu\text{m}$  microbeads with different surface groups. Time-averaged MSD of 1  $\mu\text{m}$  microbeads embedded in the mesogleal ECM as a function of the lag time. The microprobes were injected and visualized together and each symbol represents the MSD of a different microbead. The solid line in each figure indicates a slope of one. (A) MSD of polystyrene microbeads in juvenile jellyfish. (B) MSD of amine-modified microbeads in juvenile jellyfish. (C) MSD of polystyrene microprobes in adult jellyfish. (D) MSD of amine-modified microprobes in adult jellyfish. Microrheological results obtained with different microbead surface chemistry are similar, in both juvenile and adult jellyfish.

## Supporting references

1. Chapman, D. M. 1999. Microanatomy of the bell rim of *Aurelia aurita* (Cnidaria: Scyphozoa). *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne de Zoologie* 77:34-46.
2. Shaposhnikova, T., I. Matveev, T. Napara, and O. Podgornaya. 2005. Mesogleal cells of the jellyfish *Aurelia aurita* are involved in the formation of mesogleal fibres. *Cell Biol. Int.* 29:952-958.
3. Rasband, W. S. 1997-2007 ImageJ. Bethesda, MD: US National Institutes of Health. See <http://rsb.info.nih.gov/ij/>. Source code for the plugin is available at <http://www.msc.univ-paris-diderot.fr/~olivier/ImageJ/>; tracker\_install.zip; 29/03/2009.
4. Abou, B., C. Gay, B. Laurent, O. Cardoso, D. Voigt, H. Peisker, and S. Gorb. 2010. Extensive collection of femtolitre pad secretion droplets in the beetle *Leptinotarsa decemlineata* allows nanolitre microrheology. *Journal of the Royal Society Interface* 7:1745-1752.

